ISSN 0073 – 9901
MIBUAH

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA
INSTITUTO BUTANTAN
SÃO PAULO, SP – BRASIL

Memórias do Instituto Butantan

VOLUME 55, NÚMERO 1, 1993

• NESTA EDIÇÃO
BOLETIM DE
BIOTECNOLOGIA, V. 4

SciELO

As "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" têm por finalidade a apresentação de trabalhos originais que contribuam para o progresso nos campos das Ciências Biológicas, Médicas e Ouímicas, elaborados por especialistas nacionais e estrangeiros.

São publicadas sob a orientação da Comissão Editorial, sendo que os conceitos emitidos são de inteira responsabilidade dos autores.

The "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" are the vehicle of comunication for original papers written by national and foreign specialists who contribute to the progress of Biological, Medical and Chemical Sciences.

They are published under the direction of the Editorial Board which assumes no responsability for statements and opinions advanced by contributors.

Diretor do Instituto Butantan
Dr. Isaias Raw
Comissão Editorial
Henrique Moisés Canter — Presidente
Ivan Mota — Membros
Tetsuo Yamani
Maria Nazareth Rabello-Gay
Luciana Cezar de C. Leite

Renata Lara Paes de Barros — Bibliotecária

Indexado/Indexed: Biosis Data Base, Current Contents, Index Medicus.

Periodicidade: Irregular
Permuta/Exchange: são feitas entre entidades governamentais, com publicações congêneres, mediante consulta prévia. Exchanges with similar publications can be settled with academic and governmental institutions through prior mutual agreement.
Endereço/Address. Instituto Butantan — Biblioteca. Av. Vital Brasil, 1.500
05503 — 900 — São Paulo, SP — Brasil
Telefone/Telephone: (011) 813-7222 — R. 2129 — Telex: (011) 83325 BUTA-BR
Telefax: (011) 815-1505

SciELO

Governo do Estado de São Paulo
Secretaria de Estado da Saúde
Coordenação dos Institutos de Pesquisa
Instituto Butantan — São Paulo — SP — Brasil

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO BUTANTAN

Volume 55, número 1, 1993

São Paulo, SP — Brasil
1993

SciELO

MEMÓRIAS do INSTITUTO BUTANTAN. (Secretaria de Estado da Saúde).
São Paulo, SP — Brasil, 1918 —

1990, *52* (1—3, supl.)
Em apenso, a partir de 1990, *52*(3): BOLETIM DE BIOTECNOLOGIA
1991, *53*(1, Supl. 1,2)
1992, *54* (1,2)
1993, *55*(1,

ISSN 0073-9901
MIBUAH

CDD 614.07205

Solicita-se permuta/Exchange desired

SciELO

Mem. Inst. Butantan
v. 55, n. 1, 1993

SUMÁRIO/CONTENTS

The envenomation by *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat: age and sex influence.
Efeitos do veneno do escorpião *Tityus serrulatus:* influência do sexo e da idade.

Maria Regina L. SANDOVAL, Valquiria A.C. DORCE 5

Influencia de la temperatura sobre la digestion en *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae).
Influence of temperature on digestion in *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae).

Flavio FRANCINI, Carlos S. GRISOLIA, Nestor O. STANCHI, Fabio O. PELUSO 11

Epidemiologia do acidente por aranhas do gênero *Loxosceles* (Heinecken & Lowe) no estado do Paraná (Brasil).
Accidents by spiders of the genus *Loxosceles* (Heinecken & Lowe) in the Paraná state, Brazil: epidemologic data.

Lindioneza A. RIBEIRO, Vera Regina D. von EICKSTEDT, Gisélia B.G. RUBIO, José F. KNOLSAISEN, Zuhrer HANDAR, Marlene ENTRES, Vera A. Fischer Pires de CAMPOS, Miguel Tanús JORGE. 19

Diagnosis and treatment of acariasis in mice.
Diagnóstico e tratamento de acaríase em camundongos.

Fernando SOGORB S., Sueli Blanes DAMY, Ana Paula ROCHA DA SILVA, Ubimara Pereira RODRIGUES, Luziani CHAGURI. 27

Ovarian cycle of the snake *Bothrops jararaca*
Ciclo ovariano de serpentes *Bothrops jararaca.*

Thélia R.F. JANEIRO-CINOUINI, Frederico F. LEINZ, Eduardo C. FARIAS 33

SciELO

BOLETIM DE BIOTECNOLOGIA

Otimização do processo de purificação industrial de toxoide tetânico por gel filtração.
Improvement in the industrial purification of tetanus toxoid by gel filtration.

Sally M.A. PRADO, Mary D.C. VANCETTO, José M. de OLIVEIRA, Fernando FRATELLI, Sandra de J.D. MATHIAS, Hisako G. HIGASHI . . . 3

Esquema de hiperimunização eqüina mais conveniente à produção de plasma antiveneno Botrópico-Crotálico.
A more suitable equine hyperimmunization schedule for antivenom Bothrops--Crotalus plasma production.

Celso P. CARICATI, Rosalvo GUIDOLIN, Ivone K. YAMAGUSHI, Josefina F. MORAIS, Wilmar DIAS DA SILVA, Hisako G. HIGASHI 9

BHK cellgrowth on microcarriers in a bioreactor.
Crescimento de células BHK em microcarregadores utilizando bioreactores.

Ronaldo Z. MENDONÇA, Carlos A. PEREIRA 13

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
v. 55, n. 1, p. 5-10, 1993.

THE ENVENOMATION BY *TITYUS SERRULATUS* SCORPION VENOM IN THE RAT: AGE AND SEX INFLUENCE

Maria Regina L. SANDOVAL
Valquiria A.C. DORCE

ABSTRACT: This study was designed in order to investigate possible differences between the LD50 values obtained in adult and new-ablactate male rats and the influence of sex on the development of the lung edema induced by *Tityus serrulatus* scorpion whole venom. The scorpion venom LD50 (by intravenous route) obtained in adult and new-ablactate male rats were similar. Intravenous injection of scorpion whole venom, in both male or female rats, also induced a similar lung edema whereas rats ovariectomized and treated with estrogen developed a more severe edema. It is suggested that estrogen treatment may facilitate the lung edema development.

KEYWORDS: Scorpion venom, lung edema, LD50 in rats, ovariectomy.

INTRODUCTION

The scorpion *Tityus serrulatus* posses a powerful venom which may cause, in human adults, a very painful response with more or less noticeable systemic effects of transient character. Even in these cases there may not exist serious danger of death, unless the victim is a very tiny child[5].

Intravenous injection of scorpion whole venom [12,14] or of scorpion purified toxin (tityustoxin) in rats causes lung edema [9]. This effect is due, at least in part, to severe cardiovascular alterations and to the release of catecholamines and kinins, that increase the pulmonary vascular permeability[7,10]. Irregular and deep respi-

Laboratório de Farmacologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.
Research supported by CNPq
Correspondence: Dra. M.R.L. Sandoval, Serviço de Farmacologia, Instituto Butantan. Av. Vital Brasil, 1.500 — CEP 05503-900, São Paulo, SP-Brasil.
Recebido para publicação em 28.01.92 e aceito em 01.12.92.

SciELO

ration, increase of bronchial secretion and tachypnea are among the more frequent symptoms of the poisoning [7] Apnea is one of the more frequent causes of death[6].

Azevedo et al[2] observed that the pulmonary edema induced by tityustoxin (1.0 mg/kg) is more severe in female than in male rats; all rats that died due to the toxin effects were female and showed hemorragic lung edema.

The present study was designed: (a) to observe the changes in the lung edema caused by scorpion whole venom in male rats and in normal or ovariectomized female rats treated or not with estrogen or progesterone; (b) to determine if young rats are more susceptible to the venom lethal effects.

MATERIAL AND METHODS

Genetically similar adult Wistar female and male rats (180-250g, 2 or 3 months old) and newly-ablactated male rats were used. Upon their arrival in the laboratory (5 days before the beginning of the experiments), the rats were grouped, 5 per plastic cage (40x34x17 cm) with free access to food and water.

The following substances were used: 17- beta- estradiol (Benzoginoestril-SARSA), progesterone (Depo-Provera — Upjon) and peanut oil. The lyophilized *Tityus serrulatus* scorpion venom from the Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, was stored at -20°C and dissolved in 0.9% NaCl, in the concentration of 6.0 mg/ml. Solutions used in the experiments were diluted immediately before the injection in the tail vein.

1. Influence of age on the lethality induced by scorpion whole venom.

Venom dose-response curves were constructed for new-ablactate and adult male rats. Different doses of venom were injected intravenously to six rats of each group. As control, six adult or new-ablactate rats of each group received NaCl 0.9% (1 ml/kg, i.v). The animals were observed for 24 hr. The number of animals that died was recorded. The method proposed by Litchfield and Wilcoxon[11] was used to construct dose-response curves, to determine the dose causing death in 50% of the animals used (LD50) and to test for parallelism between the curves obtained.

2. *Influence of sex on the scorpion venom-induced lung edema.*

Sixty female rats were ovariectomized at 55-60 days of age: rats were anesthetized with pentobarbital plus ether; an incision of 1 cm was performed bilaterally in the dorsal region of the animal body, close to the last rib and the ovaries were removed. Starting twenty-one days after surgery, the rats were divided into three groups that were treated once a day for 5 days with 17-beta-estradiol (0.25 mg/day), progesterone (1.0 mg/day) or peanut oil (0.2 ml/day) subcutaneously. In the morning of the 6th day each group was divided at random in two subgroups which received intravenously 0.9% NaCl or 0.4 mg/kg of scorpion venom.

One group of 10 normal female rats received 0.4 mg/kg of scorpion venom and another group of 11 normal female rats received 0.9% NaCl solution. And finally, one group of 10 male rats received 0.4 mg/kg of scorpion venom and another group of 9 males received 0.9% NaCl solution.

Sixty minutes after the injection of scorpion venom or 0.9% NaCl solution (control groups), the rats were anesthetized with ether and exsanguinated. The lungs were removed free from the trachea and weighed. The severity of the pulmonary edema was estimated through the lung/body index which was calculated by mul-

SciELO

tiplying the lung weight by 100 and dividing the result by the body weight[9]. The data obtained were subjected to the ANOVA analyses of variance followed by Duncan's test. Significant differences were considered at the level of $p < 0.05$.

RESULTS

1. Influence of the age on the lethality induced by scorpion whole venom.

The Table 1 shows the LD50 values obtained in the new-ablactate (0,63 mg/kg) and in the adults (0.56 mg/kg) rats. It was not observed a significant difference between both values.

Few seconds after the i.v. administration of different doses of venom, the rats started to show the symptoms of envenomation: excessive lacrimal and salivary secretions, tremors, locomotion difficulty, cyanosis, prolonged periods of apnea, muscular spasms, convulsions, and death. The appearance of symptoms was dose dependent.

TABLE 1

Determination of the LD50[1] of the scorpion whole venom in new-ablactate or adult male rats (i.v., 24 h observation).

Group of rats	LD50 (mg/kg)	Slope[2]	LD50 ratio
New-ablactates	0.63 (0.48-0.82)	1.42 (1.00-2.02)	1.125
Adults	0.56 (0.37-0.87)	1.78 (0.86-3.67)	

1 — dose causing death in 50% of the rats used. 95% confidence limits in parenthesis.
2 — Slopes of the dose-response curves.

2. Influence of sex on the scorpion venom-induced lung edema.

As may be seen in Table 2, scorpion venom (0.4 mg/kg) induced a similar pulmonary edema into normal male and female rats ($p > 0.05$). The group of ovariectomized rats treated with vehicle and injected with scorpion venom did not differ from that of ovariectomized rats treated with vehicle and injected with 0.9% NaCl ($p < 0.05$). Table 2 also shows that the ovariectomized rats treated with progesterone did not present lung edema after the injection of scorpion venom (0.4 mg/kg). However, the administration of the same dose of scorpion venom to estrogen treated ovariectomized rats induced pulmonary edema ($p < 0.05$) that was more intense than that observed in male, ovariectomized and normal female rats ($p < 0.05$, Table 2). Actually, 26.5 per cent of the ovariectomized rats treated with venom (plus vehicle, estrogen or progesterone) died between 10-24 minutes after venom injection i.e. before the sacrifice time. However, it was not possible to establish a correlation between the severity of the lung edema and the period after which death occurred.

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

TABLE 2

Lung/body index measured after the i.v. injection of scorpion whole venom (0.4 mg/kg) in normal male and female rats or ovariectomized rats treated during 5 days with vehicle (peanut oil, 0.2 ml/day), estrogen (0.25 mg/day) or progesterone (1.0 mg/day).

Experimental conditions	Number of rats	Lung/body index (mean ± SEM)
Normal male rats		
0.9% NaCl	09	0.47 ± 0.02
scorpion venom	10	0.64 ± 0.05*
Normal female rats		
0.9% NaCl	11	0.47 ± 0.01
scorpion venom	10	0.61 ± 0.03*
Ovariectomized rats		
vehicle + 0.9% NaCl	07	0.56 ± 0.01
vehicle + scorpion venom	09	0.61 ± 0.02
estrogen + 0.9% NaCl	09	0.56 ± 0.02
estrogen + scorpion venom	13	0.77 ± 0.05*#
progesterone + 0.9% NaCl	10	0.55 ± 0.02
progesterone + scorpion venom	12	0.57 ± 0.02

* — significantly different from its respective control group ($p < 0.05$, ANOVA and Duncan's test).

\# — significantly different from male, ovariectomized and normal female groups treated with scorpion venom ($p < 0.05$, ANOVA and Duncan's test).

DISCUSSION

When inoculated by subcuteneous, intraperitoneal or intravenous route the scorpion venom is rapidly absorved. Thus, the signs and symptoms of the envenomation are rapidly consolidated. However, the concentration needed for obtainning the same effects by the three routes are sensibly different. For this reason the venom LD50 was determined by the intravenous route since a smaller quantity of venom was necessary to cause death.

It is known that the venom quantity that the scorpion *T. serrulatus* can inoculate in their victims is small. In this way, Bucherl [4] reported the extraction of a maximum of 4 mg of venom per escorpion through electric shock. It is belived that this is the reason for the benignity the accidents in adults. As the values of the LD50 obtained in adult male and in new-ablactate rats did not show differences, it seems that the major severity observed of the accidents in children is really induced by the greater quantity of venom inoculated per kilo of weight.

Also relevant are the effects on the animal respiratory apparatus. Thus, it has been reported that injection of scorpion whole venom[3,12,14] or tityustoxin[9] induced lung edema. The present study showed that the lung edema obtained in normal male and female rats, injected with *T. serrulatus* scorpion venom (0.4 mg/kg i. v.) was similar. These data are in opposition to the observations of Azevedo et al [2]. The use of a purified toxin, tityustoxin, and/or the estrus cycle phase of the normal females involved in the study could be responsible for this discrepancy.

SciELO

The presence of lung edema induced by scorpion venom was observed after the estrogen replacement in ovariectomized rats. This edema was more intense than the one devoloped by normal or ovariectomized femele and male rats.

It has been also showm that scorpion venom administration causes an hemodynamic effect characterized by an abrupt and dramatic rise of systemic arterial pressure (afterload) due to the release of catecholamines with stimulation of alpha adrenergic receptors; this effect plays an important role in the pathogenesis of acute pulmonary edema[9]. This acute arterial hypertension would evoke a left ventricular failure and pulmonary edema[8]. A relative and temporary myocardial hypoxia caused by catecholamines released by the venom toxins could also play a role in the ventricular failure[1,2].

Another factor contributing to the genesis of the pulmonary edema would be an increase in the blood venous return. This would induce an increase in preload leading to pulmonary congestion[8].

The effect of estrogens inducing retention of salt and water[13] associated with the scorpion venom effect could explain the potentiation of the lung edema observed in estrogen treated ovariectomized rats. Thus, estrogen induced hydric retention could contribute to a ventricular overloading, causing a potentiation of the lung edema.

In conclusion, the results of the present work show that age does not alter the LD 50 of the scorpion venom in rats but they point to the fact that estrogen can potentiate venom effects, so female rats in estrus phase appear to be more susceptible to the venom. Therefore, it seems worthwhile to proceed the study of the scorpion envenomation of rats in the different phases of the physiological estrus cycle.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to Professora Zuleika P. Picarelli for her comments on the manuscript. This work was supported by grants from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

RESUMO: Este trabalho teve por objetivo determinar se há diferença entre as DL50 do veneno bruto do escorpião *T. serrulatus* obtidas em ratos machos adultos e recém-desmamados e se há influência do sexo no desenvolvimento do edema pulmonar induzido pelo mesmo veneno. As DL50 obtidas para ratos machos adultos e recém-desmamados foram similares. A injeção endovenosa do veneno induziu edema pulmonar semelhante em ratos machos e fêmeas normais, enquanto ratas ovariectomizadas e tratadas com estrógeno desenvolveram um edema pulmonar mais intenso. Os dados sugerem que o tratamento com estrógeno pode facilitar o desenvolvimento do edema pulmonar.

UNITERMOS: Veneno de escorpião, edema pulmonar, DL50 em ratos, ovariectomia.

REFERENCES

1. ALMEIDA, H.O., LIMA, E.G., FREIRE-MAIA, L. Mechanism of the acute pulmonary edema induced by intracerebroventricular injection of scorpion toxin (tityustoxin) in the unanesthetized rat. *Toxicon*, v. *14*, p. 435-440, 1976.

SciELO

2. AZEVEDO, A.D., SILVA, A.B., CUNHA-MELO, J.R., FREIRE-MAIA, L. Cardiovascular and respiratory effects induced by a purified scorpion toxin (tityustoxin) in unanesthetized rats. *Toxicon,* v. *21,* p. 753-759, 1983.
3. BERTKE, E.M., ATKINS, J.H. Effects of *Centruroides sculpturatus* venom upon rat tissue: a histopathologic study. *Toxicon, v. 2,* p. 205-209, 1964.
4. BUCHERL, W. Escorpionismo no Brasil. *Mem. Inst. Butantan,* v. *34,* p. 9-24, 1969.
5. _____. Venomes of Titynae. In: BETTINI, S., ed. *Arthropods venoms.* Berlin: Springer — Verlag, 1978. v. *14.*, p. 371-394.
6. _____. Classification, biology and venom extraction of scorpions. In: BUCHERL, W., BUCKLEY, E., ed. *Venomous animals and their venoms.* New York: Academic Press, 1978. v. *3,* p. 317-347.
7. FREIRE-MAIA, L., CAMPOS, J.A. On the treatment of the cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. *Toxicon,* v. *25,* p. 125-130, 1987.
8. _____. Patophysiology and treatment of scorpion poisoning. In: OWNBY, C.L., ODELL, G.V., ed. *Natural toxins.* Oxford: Pergamon Press, 1989. p. 139-159.
9. FREIRE-MAIA, L., ALMEIDA, H.O., CUNHA-MELO, J.R., AZEVEDO, A.D., BARROSO, J. Mechanism of the pulmonary edema induced by intravenous injection of scorpion toxin in the rat. *Agents Action,* v. *8,* p. 113-118, 1978.
10. GUERON, M., OVSYSHCHER, I. What is the treatment for the cardiovascular manifestations of scorpion envenomation? *Toxicon,* v. *25,* p. 121-124, 1987.
11. LITCHFIELD, J.T., WILCOXON, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. exp. Ther.,* v. *96,* p. 99-113, 1949
12. MAGALHÃES, D. Escorpionismo. III*: An. Fac. Med. B. Horizonte,* v. *4,* p. 1-84, 1935.
13. MURAD, F., HAYNES-JR., R.C. Estrogen and progestins. In: GILMAN, A.G., GOODMAN, L.S., RALL, T.W., MURAD, F., ed. *The pharmacological basis of therapeutics.* New York: MacMillan, 1985. p. 1412-1439.
14. ROSSI, M.A., FERREIRA, A.L., PAIVA, S.M. Fine structures of pulmonary changes induced by Brazilian scorpion venom. *Arch. Pathol.,* v. *97,* p. 284-288, 1974.

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
v. 55, n. 1, p. 11-17, 1993.

INFLUÊNCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LA DIGESTIÓN EN *CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS* (SERPENTES: VIPERIDAE: CROTALINAE)

Flavio FRANCINI
Carlos S. GRISOLIA
Nestor O. STANCHI
Fábio O. PELUSO *

RESUMEN: se analizó para *Crotalus durissus terrificus* la duración de la digestión bajo distintas temperaturas (25°C y 30°C). Para el lote a 30°C, el tratamiento del alimento hasta la deposición fue un 51% más rápido que para el lote a 25°C (15 días contra 24 en valores promedio). A la temperatura más alta la frecuencia con que depusieron los animales, fue un 50% mayor que en los de temperatura baja. A menor temperatura, la tendencia a acumular excretas de diferentes ingestas (episodios alimentarios) en la misma deposición, fue mayor. A 25°C, el 67% de los restos en la deposición correspondieron a una y dos ingestas distintas; el 23% restante acumuló tres, cuatro y cinco ingestas. Por otro lado, a 30°C, el 97% de las deposiciones correspondieron a una y dos ingestas, siendo el 3% restante sólo para tres ingestas. No se hallaron diferencias estadisticamente significativas, en cuanto al efecto de la temperatura sobre la digestión, entre los sexos, peso de los ejemplares ni a diferentes edades de los mismos. Tampoco se comprobó incidencia de la frecuencia de alimentación que pudiera actuar conjuntamente con la temperatura en la variación de la velocidad de digestión. Se analizó y comparó la aparición de diferentes restos óseos y faneras en las deposiciones en ambos lotes.

PALABRAS CLAVE: Crotalus, digestion, temperatura, cautiverio

* Laboratorio y Museo de Animales Venenosos de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata.
Calles 60 y 120 La Plata (1900) — Argentina.
Recebido para publicação em 30.3.92 e aceito em 28.12.92.

SciELO

FRANCINI, F., GRISOLIA, C.S., STANCHI, N.O., PELUSO, F.O. Influencia de la temperatura sobre la digestion en **Crotalus durissus terrificus** (Serpentes: Viperidae: Crotalinae). **Mem. Inst. Butantan**, v. **55**, n. 1, p. 11-17, 1993.

INTRODUCCION

Numerosos trabajos apuntalan la ídea que, de los factores externos que afectam el proceso de digestión en animales poiquilotermos, la temperatura ambiente es el que tiene una influencia decisiva sobre el mismo (Para peces[15,16]; anfibios[10,29]; tortugas[3]; ofidios[23] y saurios[14].

En el caso de los reptiles, y en particular de los ofidios, la fisiología digestiva se halla enmarcada en tomas de alimento volumetricamente importantes en relación al peso del animal y a intervalos irregulares, muchas veces con largos períodos de ayuno entre ingestas. A éstas sigue una respuesta termofílica de búsqueda de un óptimo de temperatura para la digestión, comportamiento demostrado en tortugas[5], lagartos[1,9], cocodrilos[2] y ofidios[6,11,17,18,19,20,21,22,24,25].

La velocidad de digestión aumenta al aumentar la temperatura, posiblemente en correspondencia con un aumento de la secreción gástrica[2,14,26,27].

Temperaturas extremas, menores de 5°C y mayores de 35°C, afectan de modo importante el proceso digestivo y pueden resultar limitantes para la supervivencia de los ofidios[20,26], máxime cuando se consideran condiciones de cautividad donde la actividad termofílica se ve limitada por las dimensiones del habitáculo. En nuestro caso se testeó la variación de la duración de la digestión en función de la temperatura dentro del rango térmico al cual están sometidos dos animales en nuestro laboratorio.

Más allá de las conclusiones estrictamente concernientes al aspecto fisiológico de la relación Temperatura/Velocidad de digestión, es de suma importancia para un laboratorio productor de veneno considerar estos parámetros en función de la disminuición de factores de stress que pueden afectar la supervivencia de los ofidios sometidos a extracciones periódicas.

MATERIAL Y METODO

Se trabajó con un stock de 30 ejemplares de *Crotalus durissus terrificus* de diferentes peso y edad durante un período de cuatro meses. El stock fue dividido en dos lotes de 15 ejemplares cada uno, sometidos a dos temperaturas: ''alta'' ($\bar{x}$ 30°C) y ''baja'' ($\bar{x}$ 25°C). El bioterio fue mantenido a una humedad ambiente promedio del 75%, e iluminado con luz natural.

Los ofidios fueron alojados en cajas individuales de 50 x 50 x 18 cm, de acrílico transparente, con tapa corrediza de alambre tejido, y con un bebedoro plástico con agua en forma permanente. El piso de la caja fue cubierto con una cama de viruta de madeira de 3 cm de alto.

Con respecto a la alimentación, una vez a la semana se les entregó a los ofidios ratones vivos *(Mus musculus)* de 25 gr de peso promedio.

Por ingesta se considera todo el volumen de comida consumido en el mismo episodio alimentario. Para poder relacionar la deposición con la ingesta semanal, se ató nacimiento de la cola de los ratones una bolita plástica de 0,5 cm de diámetro, de diferente color para cada ingesta. De este modo pudo ser reconocida con facilidad la ingesta a que corresponde la deposición. El tiempo de digestión se consideró como el comprendido entre la alimentación y la aparición del marcador en las heces.

Durante el período de desarrollo del presente trabajo no se efectuaron extracciones de veneno ni otras actividades que pudieran ejercer un stress adicional a la cautividad.

SciELO

Para el análisis de los datos se emplearon los estadísticos de correlación, error standard y análisis de varianza según Ledesma [13] y Kohan & Carro[12].

RESULTADOS

A) DURACION DE LA DIGESTION EN FUNCION DE LA TEMPERATURA: el análisis de la interdependencia entre la temperatura y la duración del tránsito digestivo, arrojó una correlación negativa de 0,86 con un error standart de 0,001. Al estudiar el efecto de la temperatura entre los lotes, se observó una diferencia estadisticamente significatica (P 0,05) en el tiempo que media entre la ingesta y la deposición. Para el lote a 25°C, el valor en días del tránsito fue de 24,78 como promedio, mientras que para el lote a 30°C, el promedio fue de 15,86 días (Tabla I). Relacionado con esto, cuando se analizó la frecuencia de las deposiciones en ambos lotes, se observó que, mientras el lote de temperatura baja, habiendo ingerido alimento 143 veces, depuso 62 veces (0,43 deposiciones por ingesta), el lote de temperatura alta, habiendo ingerido 128 veces depuso 108 veces (0,84 deposiciones por ingesta) (Tabla I).

Cuando se analizaron los colores de las marcas para estudiar las frecuencias de ingestas diferentes por deposición, para el lote de temperatura baja, el 16,32% de las veces se hallaron bolitas de un solo color (una sola ingesta), el 51% de las veces, bolitas de dos colores (dos ingestas), el 18,3%, tres colores, el 8,1% cuatro colores y el 6,3% cinco colores. Para el lote de temperatura alta, el 63,7% de las veces apareció un solo color de bolitas, el 33,3%, bolitas de dos colores y el 3% para tres colores. No se hallaron en este lote deposiciones con cuatro o cinco colores distintos juntos (Tabla I).

Se analizó también la duración de la digestión de cada lote en relación al sexo, peso y edades de los ejemplares, no encontrándose diferencias estadisticamente significativas.

B) INFLUENCIA DE LA PERIODICIDAD DE LA ALIMENTACIÓN SOBRE LA DURACIÓN DE LA DIGESTIÓN: se comparó la duración del tránsito digestivo bajo condiciones de ingestas periódicas cada siete días, con la duración de la digestión por ingestas aisladas (animales alimentados una vez depuesta la ingesta anterior). Para ingestas aisladas el promedio fue de 14,36 días para el lote de altas temperaturas y 22,8 días para bajas. Estos valores no difieren estadisticamente de los hallados para los lotes alimentados periodicamente.

C) INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LA TOMA DE ALIMENTO Y REGURGITACION: no se observó diferencia en cuanto a la cantidad de presas aceptadas por ingesta entre los lotes. Para ambos casos, los animales engulleron el 97% de las presas ofrecidas. A las temperaturas consideradas, no hubo casos de regurgitación.

D) PRESENCIA DE RESTOS OSEOS EN LAS DEPOSICIONES: se analizaron macroscopicamente las deposiciones de los ejemplares pertenecientes a ambos lotes, no encontrándose diferencia de grado de digestión de los restos óseos hallados. En las heces de cada lote, se encontraron restos óseos en gran cantidad, correspondientes a distintos tipos de huesos, desde cortos (carpo, tarso, vértebras) hasta largos (femur, tibia peroné, húmero, cúbito, radio, costillas), además de cinturas y fragmentos de craneo con mandídulas enteras con dientes en posi-

SciELO

ción. Los huesos presentaron distintos grados de destrucción, tanto mayor cuando más fino el espesor de los mismos, como por ejemplo costillas y huesos del techo craneal. En las deposiciones de los dos lotes se encontraron, además, faneras (pelos y uñas) en gran cantidad sin signos aparentes de acción digestiva sobre ellos.

TABELA 1

Cuadro comparativo de la influencia de la temperatura sobre algunos aspectos de la fisiológia digestiva en *Crotalus durissus terrificus*

Duración tránsito intestinal en función de la temperatura bajo periodicidad alimentaria	
25°C	*30°C*
$\bar{x}$ = *24,78 días*	$\bar{x}$ = *15,86 días*
Frecuencia deposiciones por ingesta en función de la temperatura	
25°C	*30°C*
Nº ingestas — *Nº deposiciones*	*Nº ingestas* — *Nº deposiciones*
143 — *62*	*128* — *108*
(0,43 depos/ingesta)	*(0,84 depos/ingesta)*
Frecuencia aparición ingestas distintas por deposición	
25°C	*30°C*
16,3% — 1 ingesta	*63,7% — 1 ingesta*
51,0% — 2 ''	*33,3% — 2 ''*
18,3% — 3 ''	*3,0% — 3 ''*
8,1% — 4 ''	
6,3% — 5 ''	

DISCUSIÓN

Se observó que en *Crotalus durissus terrificus,* la duración de la digestión se encuentra en función de la temperatura. El índice de correlación marca que la interdependencia de ambas variables es importante y se presenta en proporción inversa; esto es, cuando aumenta la temperatura disminuye la duración del tránsito digestivo. Esto fue comprobado también para otras especies de ofidios como *Vipera sp*[18,19,20], *Natrix sp*[26,27] y para otros grupos de reptiles tales como tortugas[5], lagartos[1,9,14] y cocodrilos[2].

Al analizar el efecto de la temperatura entre los lotes, encontramos que a 30°C la digestión se halla un 56% acelerada con respecto a 25°C, guarismos concordantes con los referidos por Nailleau para verias especies de *Vipera* a estas mismas temperaturas[20].

Con respecto al análisis de las deposiciones, encontramos que a medidad que aumenta la temperatura, la frecuencia con que deponen los animales es mayor. Así, a 25°C se hallaron 0,43 deyecciones por ingesta mientras que a 30°C, las deyecciones por ingesta fueron 0,84, un 51% mayor a las temperaturas altas con respecto a las bajas. Esto se determina por la cantidad de marcas de colores diferentes, indicadores de restos de ingestas distintas, en la misma deposición. A mayor tiempo de tránsito digestivo, hay una tendencia a acumular restos de ingestas

SciELO

diferentes en la misma deposición. A temperatura baja el mayor porcentaje corresponde a dos ingestas, y con valores no despreciables de cuatro y cinco ingestas en la misma deyección. Para temperatura alta, la tendencia a acumular restos de ingestas distintas es mucho menor, corroborado por el mayor porcentaje que en este caso corresponde a una sola ingesta, no apareciendo nunca cuatro o cinco en la misma deposición. Comparando estos valores con los hallados por Nailleau[20] para varias especies del género *Vipera*, se encontró que en *Crotalus* sp sucede exactamente lo contrario. Mientras que en *Crotalus* sp la relación entre la frecuencia de las heces con la temperatura está en proporción directa, en *Vipera* sp se halla en proporción inversa.

Cuando se analizó la duración de la digestión en función de la temperatura, se lo estudió también bajo el efecto simultáneo de otro factor, a saber, la técnica alimentaria. Para eso, se consideró la influencia de la temperatura bajo condiciones de ingestas aisladas para neutralizar el efecto que pueda ejercer una nueva presa sobre el proceso digestivo en curso. Bajo esas condiciones, la duración de la digestión para cada lote no difirió significativamente con respecto a condiciones de alimentación periódica. Esta observación contradice lo expuesto por Thomas & Pough[28] quienes referien que el tiempo de defecación está influenciado por una variedad de factores, siendo la frecuencia de alimentación uno de ellos.

En el análisis de la influencia de la temperatura sobre la toma de alimento y regurgitación se observó que a las temperaturas que fueron mantenidos los lotes no se producen alteraciones del proceso fisiológico.

Tampoco revelaron diferencias en el grado de digestión de las presas, tal el análisis macroscópico de los excrementos. Disminución de la aceptación de las presas y aún la suspención de la alimentación, o el vómito del alimento, serían frecuentes a temperaturas más bajas (menores de 10°C) y a temperaturas más altas (mayores de 35°C)[20,26] que las utilizadas en el marco de este trabajo.

En un serpentario con finalidad de productión de veneno, es importante estudiar factores que afecten procesos fisiológicos para disminuir stress e incrementar la supervivencia de los ejemplares. Conocer la duración de la digestión a distintas temperaturas, nos permite planificar las extracciones de veneno resguardando a los animales de un pico de stress durante el transcurso de este proceso fisiológico. En trabajos anteriores realizados apuntando a maximizar la produción se estudió el efecto del ayuno sobre las cantidades de veneno obtenidas, encontrándose una correlación positiva[4,8]. Mediante la regulación de la temperatura a la que se mantienen los animales, ese ayuno además se convierte en un modo de esperar a que el ejemplar se encuentre fuera de actividad digestiva al momento de ser manipuleado para la extracción.

CONCLUSIONES

La temperatura influye sobre la duración de la digestión de modo que a 30°C *Crotalus durissus terrificus*, digiere un 51% más rápido que a 25 °C. Por otro lado se observó que a 30 °C deponen más veces con respecto a la cantidad de ingestas que a 25°C (a 30°C el doble de veces por ingesta que a 25°C). A 25°C hay una tendencia mayor a acumular excretas de ingestas diferentes en las heces que a 30°C.

Del análisis de otros factores que podrían actuar concomitantemente con la temperatura, surge que la estrategia alimentaria (ofrecer presas aisladas vs periodicamente) no tiene influencia sobre la duración del proceso. Durante un proceso

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

digestivo en curso la adquisición de nuevo alimento no modifica la velocidad con que tiene lugar el mismo.

En el marco del presente trabajo, dentro del rango térmico considerado, no cabe esperar casos de regurgitación del alimento o diferencias en el grado de digestión de las presas evidenciado en las deyecciones.

El manejo de la temperatura en el serpentario productor de veneno, asociado a la técnica de extracción de la toxina, como es el ayuno previo sobre los animales, permite garantizar una digestión completa antes de la extracción, importante ya que los ejemplares serán sometidos a un agudo pico de stress que puede, de otro modo, alterar el mencionado proceso fisiológico e insidir negativamente sobre la supervivencia de los mismos.

ABSTRACT: The duration of digestion under various temperatures (25°C and 30°C) was analyzed in *Crotalus durissus terrificus*. Treatment of the food until deposition was 51% faster in the sample at 30°C than in the one at 25°C (15 days against 24 in average values). At the highest temperature the deposition frequency was 50% higher than at the lowest temperature. The tendency to accumulate the excretes of the various food intake episodes was higher at the lowest temperature. At 25°C, 67% of the residues found in the deposition corresponded to one and two different food intake episodes. The remaining 23% accumulated three, four and five food intake episodes. On the other hand, at 30°C, 97% of the depositions corresponded to one and two food intake episodes, the remaining 3% being only for three food intakes. As regards the effect of temperature on digestion, no statistically significant differences were found in relation to sex, weight or age of the animals. The frequency of food intake did not show any effect on the rate digestion in conjunction with temperature. The appearance of various rest of bones, fur and nails was also analyzed and compared in the depositions of both samples.

KEYWORDS: Crotalus, digestion, temperature, captivity

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRADSHAW, S.D., GANS, C., SAINT GIRONS, H. Behavioral thermoregulation in a Pygopodid lizard, *Lialis burtonis*. *Copeia*, p. 738-743, 1980.
2. DIEFENBACH, C.O. Gastric function in *Caiman crocodilus* (Crocodylia: Reptilia) I. Rate of gastric digestion and gastric motility as a function of temperature. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. *51A*, p. 259-265, 1975.
3. FOX, V.M., MUSACCHIA, X.S. Notes on the pH of the digestive tract of *Chrysemys picta*. *Copeia*, p. 337-339, 1959.
4. FRANCINI, F., PELUSO, F.O., GRISOLIA, C.S. Influencia del ayuno sobre la producción de veneno en *Bothrops alternatus* (Ophidia: Viperidae: Crotalinae). *Mem. Inst. Butantan, v. 53*, n. 2, p. 205-210, 1991.
5. GATTEN, R.E. Effect of nutritional status on the prefered body temperature of the turtles *Pseudemys scripta* and *Terrapene ornata*. *Copeia*, p. 912-917, 1974.
6. GREENWALD, O.E., KANTER, M.E. The effect of temperature and behavioral thermoregulation on digestive efficiency and rete in corn snakes *(Elaphe guttata guttata)*. *Physiol. Zool.*,v. *52*, p. 398-408, 1976.
7. GRISOLIA, C.S., PELUSO, F.O., STANCHI, N.O. Informe sobre la actividad del Laboratorio y Museo de Animales Venenosos de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata. *Rev. argent. Prod. Anim.*, v. *6*, n. 7/8, p. 517-519, 1986.

SciELO

8. GRISOLIA, C.S., STANCHI, N.O., PELUSO, F.O. Relación entre el período de ayuno y cantidad de veneno extraido en cautiverio. *Rev. argent. Prod. Anim.*, v. *6*, n. 7/8, p. 513-516, 1986.
9. HARLOW, H.J., HILLMAN, S., HOFFMAN, M. The effect of temperature on digestion efficiency in the herbivorous lizard. *Dipsosaurus dorsalis*. *J. Comp. Physiol.*, v. *111*, p. 1-6, 1976.
10. JOLY, J. Influence des basses temperatures sur cyclealimentaire de quelques tritons français. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, v. *83*, p. 128-131, 1958.
11. KITCHELL, J.F. Thermophilic and thermophobic responses of snakes in a thermal gradient. *Copeia*, p. 189-191, 1969.
12. KOHAN, N.C., CARRO, J.M. *Estadística aplicada*. 5. ed. EUDEBA, 1972. 368p.
13. LEDESMA, D.A. *Estadística médica*. 2. ed. EUDEBA, 1980. 620p.
14. MACKAY, R.S. Observations on peristaltic activity versus temperature and circadian rhytms in undisturbed *Varanus flavescen* and *Ctenosaura pectinata*. *Copeia*, p. 252, 1968.
15. MOLNAR, R.G., TOLG, I. Relations between water temperature and gastric digestion of largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *J. Fish. Res. Bol. Can.*, v. *19*, p. 1005-1012, 1962.
16. _____ . Experiments concerning gastric digestion of pike *Lucioperca lucioperca* L. in relation to water temperature. *Acta Biol. Hung.*, v. *13*, p. 231-239, 1962.
17. NAULLEAU, G. Etude biotélémetriques de la thermoregulation chez *Vipera aspis* (L.) élevée en conditions artificielles. *J. Herpetol.*, v. *13*, p. 203-208, 1979.
18. _____ . Action de la temperature sur la digestion chez les viperes espagnoles du genre *Vipera*. *P. Cent. Pir. Biol. Exp.*, v. *13*, p. 89-94, 1982.
19. _____ . The effect of temperature on digestion in *Vipera aspis*. *J. Herpetol.*, v. *17*, p. 166-170, 1983.
20. _____ . Action de la temperature sur la digestion chez cinq viperes européennes du genre *Vipera*. *Bull. Soc. Zool. France*, v. *108*, p. 47-58, 1983.
21. NAULLEAU, G., MARQUES, M. Etude biotélémétrique préliminaire de la thermorégulation dela digestion chez *Vipera aspis*. *C.R. Acad. Sci.* Serie D, v. *276*, p. 3433-3436, 1973.
22. REGAL, P.J. Thermophilic response following feeding in certain reptiles. *Copeia*, p. 588-590, 1966.
23. ROOT, H.D. Gastric digestion with hypothermia: observations and applications. [Thesis — University of Minnesota], p. 1-154, 1961.
24. SAINT GIRONS, H. Observations préliminaires sur la thermoregulation des vipéres d'europe. *Vie Milieu*, v. *25*, p. 137-168, 1975.
25. _____ . Thermoregulation comparee des viperes d'europe. Etude biotélémétrique. *Terre Vie*, v. *32*, p. 417-440, 1978.
26. SKOCZYLAS, R. Influence of temperature on gastric digestion in the grass snake, *Natrix natrix* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. *33*, p. 793-804, 1970.
27. _____ . Salivary and gastric juice secretions in the grass snake, *Natrix natrix* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. *35*, p. 885-903, 1970.
28. THOMAS, R.G., POUGH, F.H. The effect of rattlesnake venom on digestion of prey. *Toxicon*, v. *17*, p. 221-228, 1979.
29. WANGESTEEN, O.H., ROOT, H.D., SALMON, P.A., GRIFFEN, W.O. Depressant action of local gastric hypothermia on gastric digestion. *J.A.M.A.*, v. *169*, p. 1601-1608, 1959.

SciELO

Mem. Inst. Butantan
v. 55, n. 1, p. 19-26, 1993.

EPIDEMIOLOGIA DO ACIDENTE POR ARANHAS DO GÊNERO *LOXOSCELES Heinecken & Lowe* NO ESTADO DO PARANÁ (Brasil)

Lindioneza Adriano RIBEIRO*
Vera Regina D. von EICKSTEDT**
Gisélia Burigo Guimarães RÚBIO***
José Francisco KONOLSAISEN***
Zuhrer HANDAR****
Marlene ENTRES****
Vera A. Fischer Pires de CAMPOS*****
Miguel Tanús JORGE*

RESUMO: O elevado número de acidentes por aranhas do gênero *Loxosceles* que tem sido notificado ao Ministério da Saúde pelo Estado do Paraná (Brasil) motivou este estudo. Foram avaliados os registros do Centro de Epidemiologia do Paraná e do Centro de Informação Toxicológica de Curitiba e realizadas inspeções domiciliares em moradias de acidentados. Os 923 casos de picada atribuídos a essas aranhas em 1989 e 1990 corresponderam a 52,7% dos envenenamentos por aracnídeos naquele Estado e a 77,4% dos acidentes loxoscélicos no País nos mesmos anos. Predominaram na região metropolitana de Curitiba (91%), nos meses de outubro a março (73,9%). A aranha picou principalmente os membros inferiores e superiores (72,7%). Dos pacientes, 64,8% eram do sexo feminino e 75,2% tinham entre 10 e 50 anos de idade. Em 604 casos (84,1%) dentre 718 em que o dado foi obtido, os indivíduos picados chegaram às Unidades de Saúde depois de 12 horas do acidente. Tratamento com soro (antiveneno) foi realizado em cerca de um terço dos casos. A letalidade foi de 0,2% (2 óbitos) *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão e *L. laeta* (Nicolet) foram as principais espécies coletadas nos locais de acidentes. O loxoscelismo é, portanto, um pro-

Trabalho apresentado no IV[th] Pan American Symposioum on Animal, Plant and Microbial Toxins and II [nd] Symposium of the Brazilian Society on Toxinology, 1992, Campinas, São Paulo, Brasil.
* Hospital Vital Brazil, Instituto Butantan — CP 65 — 01059-970 — São Paulo — SP — Brasil.
** Seção de Artrópodos Peçonhentos
*** Centro de Epidemiologia do Paraná
**** Centro de Informações Toxicológicas do Paraná
***** Comissão Permanente de Coordenação e Controle de Acidentes por Animais Peçonhentos, São Paulo.
Recebido para publicação em 29.12.92 e aceito em 05.4.93.

SciELO

blema importante de saúde pública, sendo preocupante devido ao alto índice de acidentes e à elevada infestação intradomiciliar dessa aranha.

UNITERMOS: Acidentes por aranhas, loxoscelismo, epidemiologia de acidentes aracnídicos, *Loxosceles* Heinecken & Lowe.

INTRODUÇÃO

Dos 4.636 acidentes por aranhas notificados no período 1988-1989 ao Ministério da Saúde pelas 27 unidades federadas do Brasil, 956 (20,62%) foram atribuídos a aranhas do gênero *Loxosceles*[2].

Até recentemente, os dados do Hospital Vital Brazil, (Instituto Butantan), onde foi feito o primeiro diagnóstico clínico de loxoscelismo[3], e que atende anualmente cerca de 50 casos de acidentes provocados por essas aranhas na região metropolitana de São Paulo [4,6,12], constituíam a base do conhecimento desse tipo de intoxicação no País. Em 1989, Mello Guimarães *et al.* [9] mencionaram 64 acidentes loxoscélicos atendidos de janeiro de 1987 a dezembro de 1988 no Hospital de Pronto Socorro Municipal de Porto Alegre; e em 1990 Mello da Silva *et al.* [10], em um levantamento retrospectivo dos registros do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul (CT/SSMA/RS), referiram 116 casos de loxoscelismo notificados por este Estado durante 1989. Neste último trabalho é enfatizado que 72,8% dos acidentes tinham ocorrido na área metropolitana de Porto Alegre. No ano de 1985 um dos autores (VRE) recebeu do Dr. Dalton Luiz Bertoluzzi, para identificação, duas aranhas coletadas na residência de uma menina de 4 anos, que foi a óbito no Hospital São João Batista Ltda., Criciúma, SC, com insuficiência renal por picada de *Loxosceles*. As aranhas foram identificadas como *L. laeta* (Nicolet). Posteriormente, por solicitação do Centro de Informação Toxicológica de Florianópolis e do Hospital Infantil de Lajes, a mesma autora identificou outros exemplares capturados em domicílios de pacientes picados em Içara, Criciúma e Florianópolis, como *Loxosceles laeta* e *L. intermedia* Mello-Leitão. Em Lajes, aranhas do gênero *Loxosceles* estão sendo comumente encontradas em casas e apartamentos e têm provocado acidentes humanos freqüentes (Fenilli, R., com. pessoal).

No período 1989/90 o Centro de Epidemiologia do Paraná (CEPI) notificou ao Ministério da Saúde 923 casos de loxoscelismo. Devido a esse alto índice de acidentes e à requisição de grande número de ampolas de soro para o tratamento específico, a Comissão de Coordenação e Controle dos Acidentes por Animais Peçonhentos do Estado de São Paulo solicitou a duas das autoras (LAR e VRE) parecer sobre o assunto e a Secretaria Estadual de Saúde do Paraná e o Instituto Butantan firmaram convênio para analisar o problema. Neste artigo são apresentados os primeiros resultados desse estudo.

MATERIAL E MÉTODO

Foram avaliadas as planilhas de notificação de acidentes por aracnídeos, ocorridos nos anos de 1989 e 1990, encaminhadas ao Ministério da Saúde pelo Centro de Epidemiologia do Paraná. Analisaram-se dados relativos às seguintes va-

SciELO

riáveis referentes aos acidentes loxoscélicos: identificação do aracnídeo; local de ocorrência e distribuição mensal dos acidentes; idade e sexo do paciente; região anatômica picada; intervalo de tempo entre o acidente e o atendimento médico no local que realizou a notificação; tratamento instituído e evolução clínica do caso. Foram identificadas aranhas apresentadas pelos pacientes como causadoras dos acidentes ou semelhantes a elas, que se encontravam depositadas no Centro de Epidemiologia do Paraná e no Centro de Informação Toxicológica. Foram também analisadas amostras de exemplares capturadas pelos autores em inspeções domiciliares em Curitiba. Os locais de ocorrência de acidentes foram assinalados em um mapa da região.

RESULTADOS

Os 923 casos de loxoscelismo notificados ao Ministério da Saúde pelo Paraná nos anos de 1989 e 1990 corresponderam a 52,7% dos acidentes provocados por aracnídeos, no mesmo período de tempo, naquele Estado (Tabela 1) e predominaram (73,9%) nos meses de outubro a março (Fig. 1).

Quinhentos e noventa e oito pacientes (64,8%) eram do sexo feminino e a maioria (75,2%) tinha entre 10 e 50 anos de idade (Tabela 2).

A maioria das picadas se deu nos membros inferiores (42,9%) e superiores (29,8%) não tendo sido freqüentes nos pés/tornozelos e nas mãos (Tabela 3), como costuma ocorrer nos acidentes por outras aranhas.

Em 604 casos (65,4%), os picados chegaram às Unidades de Saúde depois de 12 horas do acidente (Tabela 4).

Quanto ao tratamento, foi possível obter informação em 732 (79,3%) casos. Em 342 (46,6%) foi utilizada soroterapia específica (SAA ou SAL), os demais foram tratados com corticosteróides (29,7%) ou apenas com medicamentos sintomáticos (18,8%). Foram administradas 1794 ampolas de antiveneno nos pacientes (média de 5,2 ampolas por paciente). A letalidade foi de 0,2% (2 óbitos).

O mapeamento dos locais de ocorrência dos acidentes demonstrou que no período analisado eles predominaram (91,0%) na região metropolitana de Curitiba (83% na Capital e 8% nas cidades vizinhas) e que o loxoscelismo está disseminado em todas as zonas urbanas da Capital. A identificação das aranhas indicou que a espécie predominante é *L. intermedia* Mello-Leitão e que *L. laeta* (Nicolet), também encontrada nos domicílios e áreas peridomiciliares, tem distribuição restrita.

TABELA 1

Distribuição dos acidentes segundo o aracnídeo causador (Paraná, 1989 e 1990).

Aracnídeo	número	%
Aranhas		
Loxosceles spp.	923	52,7
Phoneutria spp.	318	18,1
Lycosa spp.	73	4,2
Caranguejeira	30	1,7
Escorpiões	85	4,8
Não identificados	298	17,0
Outros	26	1,5
Total	1753	100,0

SciELO

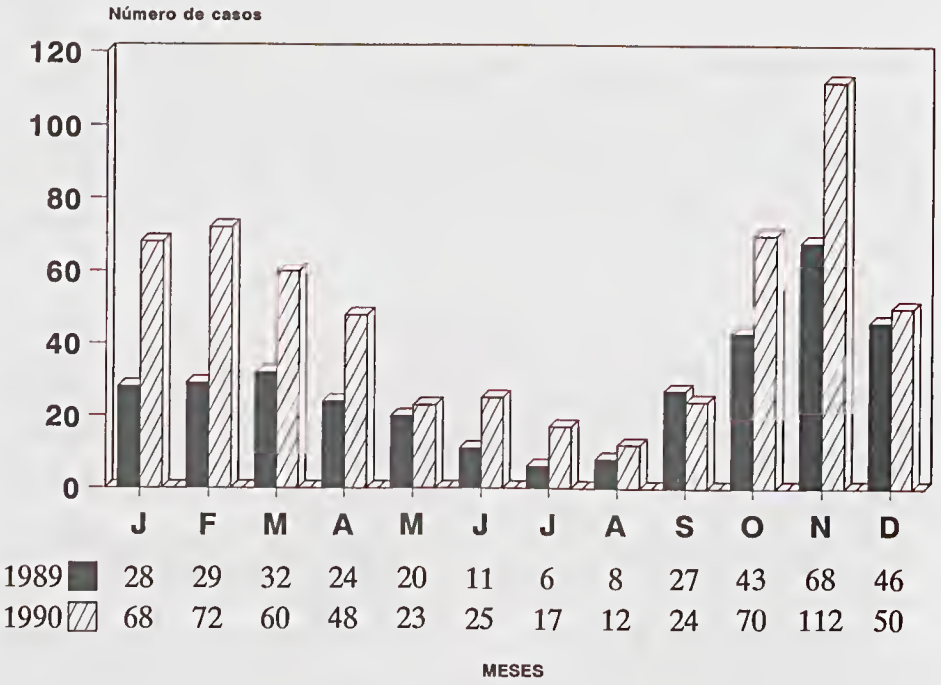

Fig. 1: Distribuição mensal dos acidentes loxoscélicos no Paraná

TABELA 2

Distribuição dos acidentes por *Loxosceles* spp. segundo a idade dos pacientes (Paraná, 1989 e 1990).

Idade	Número	%	Número médio de casos/ano idade
0 — 5	50	5,4	10,0
5 — 10	39	4,2	7,8
10 — 20	102	11,1	10,2
20 — 30	257	27,8	25,7
30 — 40	210	22,8	21,0
40 — 50	125	13,5	12,5
50 — 60	76	8,2	7,6
60 e +	44	4,8	—
Sem informação	20	2,2	—
Total	923	100,0	

SciELO

TABELA 3

Distribuição dos acidentes provocados por *Loxosceles* segundo a região anatômica picada (Paraná, 1989 e 1990).

Região anatômica	Número	%
Membros inferiores		
Pé/Tornozelo	57	6,2
Perna	217	23,5
Joelho/Coxa	107	11,6
Não especificado	15	1,6
Subtotal	396	42,9
Membros superiores		
Mão	41	4,5
Antebraço	14	1,5
Cotovelo/Braço	180	19,5
Não especificado	13	1,4
Subtotal	248	26,9
Tronco	113	12,3
Pescoço	16	1,7
Cabeça	74	8,0
Não especificada	76	8,2
Total	923	100,0

TABELA 4

Distribuição dos acidentes por *Loxosceles* spp. segundo o intervalo de tempo entre a picada e o atendimento médico (Paraná, 1989 e 1990).

Intervalo (horas)	Número	%	% acumulada
1 — 3	39	4,2	4,2
3 — 6	24	2,6	6,8
6 — 12	51	5,5	12,3
12 — 24	142	15,4	27,7
24 — 48	192	20,8	48,5
48 e +	270	29,3	77,8
Não informado	205	22,2	100,0
Total	923	100,0	

SciELO

DISCUSSÃO

A situação encontrada no Paraná, conforme dados do presente trabalho, difere da que é considerada peculiar ao loxoscelismo nas diversas partes do mundo, ou seja, ocorrência de um baixo índice de acidentes mesmo em áreas com grande densidade de aranhas[5]. O Paraná é o estado brasileiro que notifica o maior número de acidentes loxoscélicos e esse número vem crescendo progressivamente. No período 1988-1989 foram 595 casos, que corresponderam a 62,2% das notificações de acidentes por *Loxosceles* spp. e em 1989 e 1990 o total de casos chegou a 923, perfazendo 77,4% dos acidentes no País[2]. Os dados atualmente disponíveis demonstram uma nítida regionalização do loxoscelismo. Ele se concentra na região sul do Brasil e no Paraná constitui a forma mais importante de araneísmo, ao contrário de São Paulo, onde menos de 10% dos acidentes araneídicos são atribuídos a espécies de *Loxosceles*[1,2]. A prevalência dos acidentes na região metropolitana de Curitiba, a ampla disseminação da aranha e o fato de a infestação ser predominantemente intradomiciliar, como ficou evidenciado, exigem a adoção de medidas preventivas de acidentes e de controle das aranhas. É necessário diminuir os criadouros e inviabilizar a propagação dessas aranhas para outras áreas urbanizadas, do Brasil e de países limítrofes ou não, como tem ocorrido com espécies de algumas regiões do mundo.[11,16]. É também necessária uma avaliação dos fatores ambientais que estão favorecendo a infestação e de aspectos biológicos da espécie *L. intermedia* que, conforme foi verificado, é a predominante.

A distribuição mensal dos acidentes, com maior incidência nos períodos mais quentes do ano, é semelhante ao que ocorre no Estado de São Paulo[6].

A picada de aranhas do gênero *Loxosceles* tende a ocorrer principalmente em pessoas do sexo, feminino,[8], o que se deve, provavelmente, à frequência maior de acidentes nos domicílios[8,14,15]. A percentagem de picadas envolvendo pessoas desse sexo, segundo dados do presente estudo, foi ainda maior do que a relatada por outros autores[8,14,15].

A maioria das picadas se deu nas regiões proximais dos membros inferiores e superiores e no tronco. Diferentemente dos acidentes por *Phoneutria, Lycosa* ou escorpião em que predominam picadas nas mãos e pés[6], as provocadas por *Loxosceles* são mais comuns nos braços e nas pernas[6,8].

A maioria dos pacientes procurou os serviços médicos que notificaram o acidente seis ou mais horas após, o que está de acordo com a literatura. Esta providência costuma ser tardia porque, ao contrário do que ocorre com os acidentados por *Phoneutria*[7] e *Lycosa*[13], a picada por *Loxosceles* muitas vezes não é percebida, a dor tende a iniciar-se tardiamente e a suspeita de se tratar de acidente aracnídico pode não acontecer.

Menos de 30% dos pacientes avaliados receberam soro antiaracnídico ou antiloxoscélico. Isto se deve, provavelmente, à conduta de não se administrar o soro em casos de atendimento tardio, recomendada pelo Centro de Informação Toxicológica do Paraná.

A freqüência com que os acidentes ocorrem no Estado do Paraná mostra a necessidade de conhecimento mais aprofundado da distribuição das espécies de *Loxosceles* na região, das espécies predominantes e da epidemiologia do acidente.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem o apoio do Programa Nacional de Controle de Acidentes por Animais Peçonhentos do Ministério da Saúde (Dr. Francisco Anilton Alves Araújo — Gerente-Técnico)

SciELO

ABSTRACT: The high number of *Loxosceles* bites in the State of Paraná, notified to the Ministry of Health in 1989, warrants this study. A total of 923 cases was registered in the Centro de Epidemiologia do Paraná and this number corresponded to 52.7% of the arachnidic accidents reported to the Center. *Loxosceles* bites were predominant in the metropolitan region of Curitiba (83% occurred in the capital and 8% in neighboring towns). The highest incidence was from October to March (73.9%). Most of the victims (64.8%) were females and 75.2% were between 10 and 50 years old. Spider bites were most common on the lower (42.9%) and upper (29.8%) extremities but bites on the foot/ankle and the hand were unusual (6.2% and 5.3%, respectively). More than 60% of the victims arrived at the Health Unit 12 hr after the bite. Treatment with specific serum was carried out in approximately one third of the patients. The lethality was 0.2% (two deaths). Identification of spiders at the moment of the bite or shortly thereafter showed that *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão and the cosmopolitan *Loxosceles laeta* (Nicolet) were the main species involved.

KEYWORDS: Necrotic arachnidism, epidemiology of arachnidism, *Loxosceles* Heinecken & Lowe.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBUQUERQUE, M.J., PIRES DE CAMPOS, V.F., RIBEIRO, L.A., TAKAOKA, N.Y. Epidemiological and clinical aspects of accidents due to spiders in São Paulo State, Brazil, in 1988. *Toxicon*, v. *28*, p. 599, 1990.
2. ARAÚJO, F.A.A., RESENDE, C.C. Araneísmo: análise epidemiológica. Ministério da Saúde, Fundação Nacional da Saúde, Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos, 1991.
3. CARDOSO, J.L.C., DE CILLO, D.M. Primeiro diagnóstico de Loxoscelismo na casuística do Hospital Vital Brazil (HVB). *Mem. Inst. Butantan,* v. *52*, p. 81, 1990.
4. CARDOSO, J.L.C., FRANCA, F.O.S., EICKSTEDT, V.R.D., BORGES, I., NOGUEIRA, M.T. Loxoscelismo; estudo de 242 casos (1980-1984). *Revta. Soc. bras. Toxicol.*, v. *1*, p.58-60, 1988.
5. GERTSCH, W.J., ENNIK, F. The spider genus *Loxosceles* in North America, Centro America, and West Indies (Araneae, Loxoscelidae). *Bull. Amer. mus. nat. Hist.*, v. *175*, p. 264-360, 1983.
6. JORGE, M.T., EICKSTEDT, V.R.D., KNYSAK, I., FISMAN, L.F.Z., RIBEIRO, L.A. Acidentes por picada de aranha. *Arq. bras. med.*, v. *65*, p. 457-468, 1991.
7. JORGE, M.T., RIBEIRO, L.A. Acidentes por animais peçonhentos. In: AMATO-NETO, V., BALDY, J.L.C. *Doenças transmissíveis*. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 1989. p. 133-141.
8. JORGE, M.T., RIBEIRO, L.A. Epidemiologia do acidente por aranha do gênero *Loxosceles*, estudo prospectivo de 70 casos. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 26, 1990, Natal (RN). *Anais* ... Natal: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 1990. p. 103.
9. MELLO GUIMARÃES, S.V., SILVA, C.A.M., SCHEID, M.M. Acidentes loxoscélicos em Porto Alegre — RS. *Rev. Soc. bras. Toxicol.*, v. *2*, 1989. Trab. 5.42.
10. MELLO DA SILVA, C.A. TORRES, J.B., MARQUES, M.G.B., NICOLELLA, A.D.R. Aspectos epidemiológicos e clínicos de acidentes por *Loxosceles* sp. no Sul do Brasil. *Mem. Inst. Butantan,* v. *52*, p. 80-81, 1990.

SciELO

11. NEWLANDS, G. A new violin spider from Johannesburg with nota on its medical and epidemiological importance. *Zeitschr. ang. zool.*, v. *68,* p. 357-365, 1981.
12. PIESCO, R.V., CARDOSO, J.L.C., RIBEIRO, L.A., EICKSTEDT, V.R.D. Loxoscelismo — 241 casos: estudo epidemiológico e clínico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA 3, 1983, Belo Horizonte. *Anais* ... Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Toxicologia, 1983. p. 107.
13. RIBEIRO, L.A., JORGE, M.T., PIESCO, R.V., NISHIOKA, S.A. Wolf spider bites in São Paulo, Brazil: a clinical and epidemiological study of 515 cases. *Toxicon*, v. *28,* p. 715-717, 1990.
14. SCHENONE, H., RUBIO, S., VILLARROEL, F., ROJAS, R. Epidemiología y curso clínico del loxoscelismo. Estudio de 133 casos causados por la mordedura de la araña de los rincones *Loxosceles laeta*. *Bol. Chile. Parasit.*, v. *30* p. 6-17, 1975.
15. SCHENONE, H., SAAVEDRA, T., ROJAS, A., VILLARROEL, F. Loxoscelismo en Chile. Estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, v. *31,* p. 403-415, 1989.
16. SCHENONE, H., SUAREZ, G. Venoms of Scytodidae. genus *Loxosceles*. In: BETTINI, S. *Arthropod venoms*. Berlin: Springer-Verlag, 1978. p.147-275.

SciELO

Mem. Inst. Butantan
v. 55, n. 1, p. 27-32, 1993.

DIAGNOSIS AND TREATMENT OF ACARIASIS IN MICE

Fernando SOGORB S.
Sueli Blanes DAMY
Ana Paula ROCHA DA SILVA
Ubimara Pereira RODRIGUES
Luziani CHAGURI

ABSTRACTS: The efficacy and possible toxic effects of the five acaricides were analysed in their control of *Myobia musculi and Myocoptes musculinus*, in mice colony with a 50% incidence of these parasited. The result suggest that the control can be obtained by treatment with dichlorvos at 0,007%, malathion at 2% and monossulfiram at 12,5%, with 5 immersion baths at intervals of 7 days.

KEYWORDS: Dichlorvos, malathion, monossulfiram

INTRODUCTION

Myobia musculi and Myocoptes musculinus, arachnids of the subclass Acari, parasites of mice pertaining to the suborders Prostigmata and Astigmata respectively, are with frequency found in conventional colonies[7,8].

The pathological effects caused by these ectoparasites vary with strain, sex, age, and individual differences in sensibility, as well as with the type of mating used. Slight infestations in general are not apparent and the severe ones may cause traumatic dermatitis, alopecia, itching and increase of the mitotic activity of the dermal epithelium[4].

Myocoptes musculinus affect the region of the cheek, basis of the tail, inguinal and between the auricular pinna, and may disperse over the whole back. They provoke a graying of the pelage, with a progressive increase of the affected area, loss of weight, emaciation, cachexia and eventually death. All the life cycle occurs within the pelage and demands 14 days to complete, feeding on the dermal tissue[8].

From the Instituto Butantan, Biotério Central, Av. Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, Brazil.
Recebido para publicação em 09.11.92 e aceito em 12.4.93

SciELO

The *Myobia musculi* are localized in the cervix, shoulder and forelegs. They create a type of itch that is considered the most specific of mice[16]. All stages of the life cicle occur in the pelage, requering 23 days to complete, feeding on extracellular fluid[10,16,18,23]

In the control of these agents, different compounds were used, specially organophosphorized anticholinesterasics. The characteristic pharmacological effects of the anticholinesterasics primarily are due to the inhibition of inactivation of the acetylcholinesterasis in the centers of cholinergic transmission, occuring, in consequence, accumulation and supervening the actions of the endogenous acetylcholine released as by nervous cholinergic impulses, as, in less quantity, by continuous extravation during the resting phase[17,20].

These compounds are in general liquids highly soluble in lipids, undergoing rapid absorption by nearly all ducts, inclusive the digestive tube, as well, as through the skin and the mucous membranes, after the contact with the liquid form, and through the lung after inhalation of the vapors or dust and aerosol[11,13,20].

Elimination occurs through the urine in form of metabolic degradation products. Between the time of absorption and elimination there are variable periods during which the original compound or its metabolics continue combined with plasm and tissue proteins intervening in their metabolism hydrolytic as well as oxidative enzymes[11,13,20].

Among these anticholinesterasic organophosphorate compounds the following were used in the control of these acaridiasis: lindano [1,2,3,4,5,6 hexachlorocyclohexane], an organochlorate that presents as characteristics a rapid distribution through the organism after absorption, concentrating itself in the adipose tissues, specially in the brain and liver[12]. Diazinon [0,0 dietil 0-(2-isopropil-4 methil-6-pirimidyl)], proportion of SULFOTEPP, that by an oxidation process, during as improper storage, produces TEPP, a compound endowed with a high toxicity[13].

Malathion [0,0-dimethyl S-(ethyl 1,2-dicarboetoxi)], dithiophosphorate, shows also toxic impurities for several species of mammals, including man, rat and mouse. These are formed by exposition of the product to ultraviolet light or by storage at temperatures more than 40°C. The more common impurity 0,0,S- TMP, applied experimentally in mice, decreased the humoral and cell mediated immune responses. However, studies performed using concentrations of 2% and 8%, showed that the immune system of Balb/c mice, 8 weeks of age, did not change[15]. It is still observed, that Malathion is less toxic to mammals and birds than to insects, because in the superior animals its biotransformation into active products is quicker[11].

Variability of reaction to a determined drug by animals of different species may be due, at least partially, to variations in the capacity of biotransformation. There may be differences in the degradation velocity, what brings on variations in the effect intensity, leading to a quantitatively different answer[11].

Dichlorvos (DDVP) [0,0-dimethyl-2,2- dichlorovinilphosphate], chlorophosphorate, have a pharmacological action similar to that a malathion. Toxicologic studies using 500 mg of the product each kg of ration, supplied "ad libitum" to mice, showed that the seric cholinesterasis level of the animals was half the value lound in the not treated controls, remaining low for several days[9,20].

Compounds based on sulphur, as tetraethyltiuram monosulphuric acid (monosulfiram), are constituted by fine christals, containing about 36% of sulphur in an organic combination, insoluble in water, however quite soluble in alcohol and some oils, devoid of serious collateral effects[1], have a keratolytic actions that constitutes the basis of its therapeutic property. In order to exert a germicidal action, it must be converted into pentatonic acid. Presumably the oxidation of sul-

SciELO

phur to pentatonic acid is accompanied by microorganisms and epidermal cells when applied over the skin[12].

Therefore, considering that parasitism of the laboratory mice by *M.musculinus and M.musculi*, although not representing risk to the handling individuals[8], interfers in the reproductive process and in more extended experiments, the infestations may become more intense, weakening the animals and modify potencially the results[19], there may occur secondary infections by microorganisms[4], besides being considered vectors of *Philalitomosoides carini* and of several riquetsias, the present paper had as its objective to test the efficacy of different acaricides in the control of these agents.

MATERIAL AND METHODS

Mice of the ''swiss'' variety were used, maintained in popypropylene cages with pine wood shavings, changed twice a week. All material used was sterilized by humild heat[5].

The animals were maintained in an acclimatized room, with a temperature of 22°C and a light/darkness cycle of 12 hours. Water and the balanced ration in form of pellets were supplied ''ad libitum''.

For the ectoparasite research, the mice were sacrificed by cervical deslocation, placed on Petri dishes with a black paper basis, placed in an ice box for half an hour, and then exposed to a heat source, represented by an eletric light source. After a few minutes, the parasites that left the body, could be seen with the naked eye on the black paper or at the top of the hair, when examined with an entomologic magnifying glass (Wild - Heerbrugg M5) with a minimum of 60 augmentations.

The following acaricides were used, diluted in water. Lindano at 2% (1*), diazinon at 0,06% (2*), malathion at 2% (3*), dichlorvos at 0,007% (4*) and monosulfiram at 12,5% (5*) described in the introduction.

The baths were prepared in the dilutions indicated in the introduction, and the mice were held with pincers, were totally submerged in the liquid. The intervals between baths were of 7 days, repeated for three times. The ration was removed and replaced six hours later, the drinking water through was maintained.
Trademark:

(1*)	Rodane EC20	Rhodia - Merieu
(2*)	Diazinon	Ciba-Geigy
(3*)	Malatol 100E	Cyanamid
(4*)	Nuvan 1000CE	Ciba-Geigy
(5*)	Tetmosol	Welcome-ICI

RESULTS

The results of the 5 acaricides are represented in Table 1.

The mice treated with lindano and diazinon died a few hours after the bath with the first product and up to the 5th day after the bath with Diazinon.

After the results of Tabela 1, 3 groups were formed each with 200 couples of mice in reproduction age, and each group submitted to the treatments with the quimical products approved in the first test, and the animals were observed for 6 months (Table 2).

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

During the whole period of observation, 20 mice for month with 3 weeks of age were examined for the ectoparasite research, originating from each group treated with the different products. The animals were sacrificed and observed under the entomologic magnifying glass, as described under Material and Methods, no presence of ectoparasites was verified for 6 months and for more than one year no more tipical lesions appeared.

TABLE 1

Activity of lindano, diazinon, malathion, dichlorvos (DDVP) and monosulfiram as acaricides in mice, examined after 3 baths, with intervals of 7 days.

PRODUCT	Aquous dilution	No. of animals	Persistency of the parasite	% survival
Lindano	2,000	60		0
Diazinon	0,060	60		0
Malathion	2,000	60	0/60	100
Dichlorvos	0,007	60	0/60	100
Monosulfiram	12,50	60	0/60	100
Control		60	31/60*	
			30/60**	

* parasitims by *M. musculinus* (52,8%)
** parasitism by M. musculi (50%)

TABLE 2

Persistency of the parasitism by *M.musculinus* and *M.musculi* after the treatment with dichlorvos, malathion and monosulfiram in 200 couples of adult mice submitted to 3 baths a 7 days interval.

PRODUCT	Aquous dilution	MONTHS 1º	2º	3º	4º	5º	6º
Dichlorvos	0,007%	0	0	28	16	0	0
Malathion	2,000%	0	0	0	0	0	0
Monosulfiram	12,50%	0	0	0	0	0	0

DISCUSSION

The colonies of mice may contain *M. musculi* and *M.musculinus* without clinical manifestation, due to genetic factors that regulate the equilibrium of the acaridal populations since different mouse strains show variable sensitivity[3,4].

In the parasited animals, the hairs become opaque by functional disturbancy of the sebaceous glands. As a result of the pruritus, occur epithelial erosions through functional disturbance of sebaceous glands.

SciELO

Our results showed that the products lindano and diazinon, with the used dilutions, were lethal for the mice. With the first, the bathed animals died a few hours after the treatment, and with the second lot, deaths occured up to the 5th subsequente day.

The animals treated with dichlorvos showed a recurrence of 7% from the 3rd month on after the treatment, only the males with characteristic lesions and presence of *M. musculi* in the sacrificed animals. These results are in accordance with the literature as for the sensibility difference betwéen sexes and the necessity of a repetition of the treatment[22].

The use of dichlorvos in different forms of treatment[2,4,9,22] presented satisfactory results in the control of acarids and the treatment did not affect the size and the frequency of the hatch, as for the gestation period[2].

Studies done with the use of malathion in different concentration showed satisfactory results in the control of the mange mites, and no colateral effects and alterations of the immune system of mice[3,6,15], and agree with the results observed in Tables 1 and 2.

Monosulfiram in the indicated dilution eliminated the mites and did not cause any recurrence during the whole observation period. By owning a keratolyte, acarid and germicide action, being devoid of colateral effects[1,12] it may be selected as an inocous and efficacious product for treatment of acaridiasis.

CONCLUSIONS

The ectoparasites *M. musculi* and *M. musculinus* can be controlled in mouse colonies by treatments with dichlorvos at 0,007%, malathion at 2% and monosulfiram at 12,5% by five immersions baths at 7 days interval.

ACKNOWLEDGEMENTS

Our thanks to Ms. Sibilly Heller for the translation.

RESUMO: Foram analisados a eficácia e os possíveis efeitos tóxicos de 5 acaricidas, no controle de *Myobia musculi* e *Myocoptes musculinus*, em colônia de camundongos com 50% de incidência destes ectoparasitas. Os resultados sugerem que o controle pode ser obtido pelo tratamento com dichlorvos a 0,007%, malathion a 2% e monossulfiram a 12,5%, com 5 banhos de imersão, em intervalos de 7 dias.

UNITERMOS: Dichlorvos, malathion, monossulfiram

REFERENCES

1. BELDA, W. Tratamento pelo monosulfiram: nova solução para problema de escabiose. *Rev. Bras. Clin. Ter., v. 8*, n. 4, p. 309-312, 1965.
2. CASEBOLT, S.B. et al. Effect of dichlorvos treatment on mouse reproduction. *Lab. An. Sci.*, v. *40*, n. 1, p. 65-67, 1990.
3. CONSTANTIN, M. L. Effects of insecticides on acariasis in mice. *Lab. An*, v. *6*, p. 279-286, 1972.
4. CSIZA, C. K., MACMARTIN, D. N. Technical notes. Apparent acaridal dermatitis in C57BL/6 Nya mouse colony. *Lab. An. Sci*, v. *26*, n. 5, p. 781-787, 1976.

SciELO

5. DAMY, S. B. et al. Esterilização de materiais de biotério pelo calor úmido. *Mem. Inst. Butantan*, v. *52*, n. 1, p. 5-10, 1990.
6. DAVIS, R. Control of the myocoptic mange mite *Myocoptes musculinus* (Koch) on laboratory mice. *J. Ec. Ent.*, v. *50*, n. 5, p. 595-596, 1957.
7. FLYNN, R. J. et al. Pathogen status of commercialy produced laboratory mice. *Lab. An. Care.*, v. *15*, p. 440-447, 1965.
8. _____ . *Parasites of laboratory animals*. Iowa: The Iowa State University, 1973. 883 p.
9. FRASER, J. et al. The use of pelleted dichlorvos in the control of murine acariasis. *Lab. An.*, v. *8*, p. 271-274, 1974.
10. FRIEDMAN, S., WEISBROTH, S. H. The parasitic ecology of the rodent mite *Myobia musculi* IV. Life cycle. *Lab. An.*, v. *27*, n. 1, p. 34-37, 1977.
11. GIESBRECHT, A. M. Fatores que alteram os efeitos de medicamentos. In: ZANINI, A. C., OGA, S., eds. *Farmacologia aplicada*. São Paulo: Atheneu, 1979. p. 65-72.
12. HARVEY, S. C. Antiseptics and disinfectantes; fungicides; ectoparasiticides. In: GOODMAN, L. S., GILMAN, A. G., ed. *Pharmacological basis of therapeutics* .7 . ed. New York: Macmillan, 1985. p. 959-979.
13. LARINI, L. Inseticida. *In:* *Toxicologia*. São Paulo: Manole, 1987. p. 152-158.
14. MULLINK, J. W. M. A. Ratas y ratones. In: HIME, J. M., ODONOGHUE, P. N., ed. *Patologia de los animales de laboratorio*. Zaragoza: Acribia, 1985. p. 63-100.
15. RELFORD, R. L. et al. Effects of a commercial malathion dip preparation on the cellular and humoral immune response of Balb/c. *Lab. An. Sci.*, v. *39*, n. 1, p. 56-59, 1989.
16. SAIZ MORENO, L. et al. *Animales de laboratorio*: producción, manejo y control sanitario. Madrid: Serv. Pub. Agrarias, 1983. 530 p.
17. SCIVOLETO, R. Sistema nervoso autônomo. In: ZANINI, A. C., OGA, S., ed. *Farmacologia aplicada*. São Paulo: Atheneu, 1979. p. 107-143.
18. SMITH, A. W. *El raton*. 2. ed. Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, 1976. 243 p.
19. STONER, R. D., HALE, W. M. A method for eradication of the mite *Myocoptes musculinus* from laboratory mice. *J. Ec. Ent.*, v. *46*, n. 4, p. 692-693, 1953.
20. TAYLOR, R. D., HALE, W. M. Anticholinesterase agents. In: GOODMAN, L. S., GILMAN, A. G., ed. *The pharmacological basis of therapeutics*. 7. ed. New York: MacMillan, 1985. p. 110-129.
21. WATSON, D. P. The effect to the mite *Myocoptes musculinus* on the skin of the white laboratory mouse and its control. *Parasitology*, v. *51*, p. 373-378, 1961.
22. WEISBROTH, S. H. et al. The parasitic ecology of the rodent mite *Myobia musculi*. III. Lesion in certain host strain. *Lab. An. Sci.*, v. *26*, n. 5, p. 725-733, 1976.
23. WHITELEY, H. J., NORTON, D. L. The effect of *Myobia musculi* on the epidermis and hair regrowth cicle in the ageing CBA mouse. *J. Pathol. Bacteriol*, v. *83*, p. 509-514, 1962.

SciELO

Mem. Inst. Butantan
v. 55, n. 1, p. 33-36, 1993.

OVARIAN CYCLE OF THE SNAKE *BOTHROPS JARARACA*

Thélia R.F. JANEIRO-CINQUINI*
Frederico Fontoura LEINZ*
Eduardo Cunha FARIAS**

ABSTRACT: The reproductive cycle of *Bothrops jararaca* was studied through the observation of the ovarian follicles and eggs of 111 snakes during the period of one year. Vitellogenesis was observed during Autumn and Winter, and ovulation probably occurred at the beginning of Spring. Pregnancy was verified from November to March. The smallest gravid female measured 76,0 cm in snout-vent length.

KEYWORDS: Serpente, reprodução, ciclo ovariano.

INTRODUCTION

The knowledge of reproductive cycles of tropical and sub-tropical snakes is scarce, specially when compared to that of snakes from temperate regions (Shine[11,12]; Kofron[5]).

Murphy and Mitchel[8] observed the reproduction of several species of the genus *Bothrops* in captivity, and Solórzano and Cerdas[14] described the reproductive activity of several crotaline species in nature.

According to Fitch[4], the reproductive cycle involves coordinated modifications of the morphology, physiology and behavior of the species. In the female, the main morphological changes occur within the ovaries and oviducts, where the follicles ripen and synthesize vitellus up to the eventual ovulation.

Considering the existence of only a few data on the reproductive biology of *Bothrops jararaca* (Sazima[9]), our aim is the characterization of the ovarian cycle of this species, through the observation of the growth and ripening of the ovarian follicles and eggs.

*Laboratório de Herpetologia, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500 - CEP 05503-900 - S. Paulo, SP - Brasil
**Departamento de Histologia e Embriologia, ICB-USP
Recebido para publicação em 08.12.92 e aceito em 04.5.93.

SciELO

MATERIAL AND METHODS

Ovaries and oviducts of 111 adult female *Bothrops jararaca* from the South and Southeast regions of Brazil were examined in the ''Seção de Venenos'' of the Instituto Butantan during the period of one year. The female reproductive system was dissected and the ovarian follicles and eggs measured with a caliper rule ''in situ''.

The means of the ovarian follicle diameters were assembled into four groups: Class I-smaller than 0.5 cm in diameter; Class II — 0.6 to 1.0 cm; Class III — 1.1 to 2.0 cm; Class IV — 2.1 to 3.0 cm. The eggs were classified only by the mean of the diameters.

The presence or absence of sperm in the reproductive system of the females was determined by microscopy of the luminal content of the oviduct.

RESULTS

The seasonal variation of the diameters of the ovarian follicles and eggs of the snakes *Bothrops jararaca* is shown in Fig. 1.

Ovarian follicles of Class I dont were founded in some exemplaries during April, July and August, but follicles of Classes II were observed during the whole year.

Ovarian follicles of the Classes III and IV occurred during the period from April to September. They were at the stage of vitellogenesis and their maximum diameter was 3.0 cm. The presence of eggs was verified at the end of Spring and Summer.

Of a total of 111 examined females, 45 were gravid: 18 in Springtime and 27 in Summer, in different stages of embryogenesis.

The smallest gravid female measured 76.0 cm in snout-vent length.

DISCUSSION

The lack of data on the reproductive cycle of snakes from the tropical and subtropical regions, where the seasons are not well defined, induced many researchers to believe in a nonexistence of a reproductive synchronism for these reptiles (Seigel and Ford[10]). However, in our experience of monthly observation of ovaries and oviducts of 111 female *Bothrops jararaca* during one year, we verified the existence of a well-defined reproductive cycle in this species.

In snakes of temperate regions, follicular growth starts at the end of Summer, is interrupted during hibernation, and returns to grow at an accelerated rate in Spring (Aldridge[1]; Licht[7]). In *Bothrops jararaca*, follicles of Classes III and IV were found in Autumn and Winter, suggesting a continuous growth also in these seasons.

In the northern hemisphere, the different phases of the reproductive cycle of most of the snakes are well defined. Ovulation and fertilization occur at the end of Spring, and births happen at the end of Summer and beginning of Autumn (Seigel and Ford[10]). In the species under study, the ovulation probably occurs in the Spring, since, after this time, no mature follicles are found within the ovary, whereas eggs are found in the oviduct.

Studies of *Thamnophis sirtalis parietalis* (Bona-Galo and Licht[3]; Licht[7]) suggested that the mating could be a stimulus to vitellogenesis and ovulation. In the specimens of *Bothrops jararaca* that presented Class III and Class IV follicles, mobil spermatozoids were detected in the oviduct which was not the case in specimens with eggs and follicles of Classes I and II.

SciELO

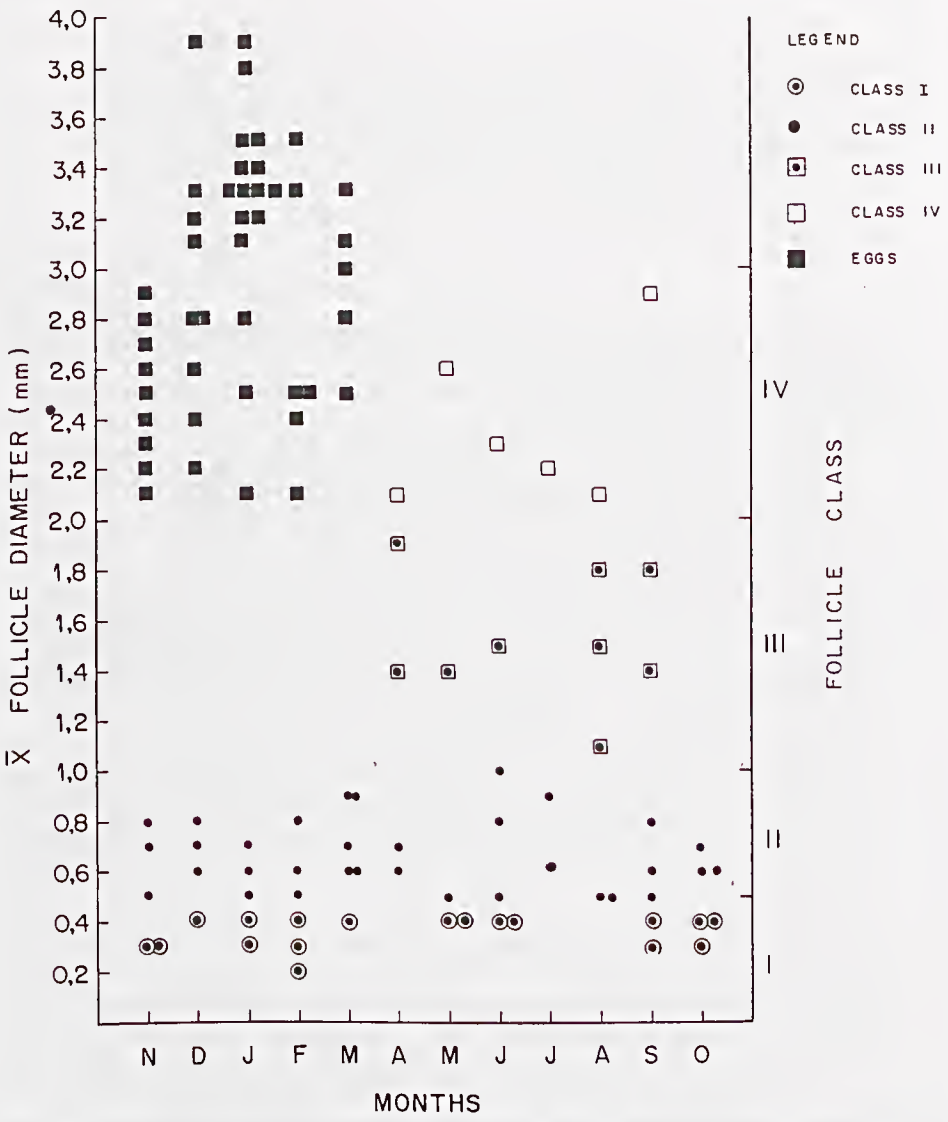

Fig. 1: Seasonal change in follicle diameter of *B. Jararaca* during 1985.

The females of snakes from tropical regions are in an advanced state of pregnancy in the hotter and more humid seasons of the year, the birth of youngs also occurring at this time. In the species under study, the presence of eggs with embryos at different stages of development was also detected in the hot and humid months. According to Shine[11] and Vinegar[14], the more constant temperature of this period guarantee a normal development of the embryos.

CONCLUSION

1 — In *Bothrops jararaca*, the reproductive period is seasonal, occurring only once per year; eggs and embryos are only observed during the hot and humid periods of the year.

SciELO

JANEIRO-CINQUINI, T.R.F., LEINZ, F.F., FARIAS, E.C. Ovarian cycle of the snake **Bothrops jararaca**. **Mem. Inst. Butantan, v. 55**, n. 1, p. 33-36, 1993.

RESUMO: O ciclo reprodutivo de *Bothrops jararaca* foi estudado através da observação dos folículos ovarianos e ovos de 111 serpentes durante o período de um ano. A vitelogênese foi observada durante o outono e inverno, ocorrendo a ovulação provavelmente no início da primavera. A prenhez foi constatada de novembro até março. A menor fêmea prenhe media 76,0 cm de comprimento rostro-anal.

UNITERMOS: Serpente, reprodução, ciclo ovariano.

REFERENCES

1. ALDRIDGE, R.D. Female reproductive of cycles the snakes *Arizona elegans* and *Crotalus viridis* in new Mexico. *J.Herpetol.*, v. *13*, p. 187-192, 1979.
2. AMARAL, A. Contribuição para o conhecimento dos ofídios do Brasil. *Mem. Inst. Butantan.* Anexos de Ofiologia, v. *1*, p. 1-88, 1921.
3. BONA-GALO, A., LICHT, P. Effects of temperature on sexual receptivity and ovarian recrudescence in the garter snake *Thamnophis sirtalis parietalis*. *Herpetologica*, v. *39*, p. 173-182, 1983
4. FITCH, H.S. Reproductive cycles in tropical reptiles. *Occas. Pap. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas*, v. *96*, p. 1-53, 1982.
5. KOFRON, C.P. Female reproductive cycle of the neotropical snaileating snake *Sibon sanniola* in northern Yucatan, Mexico. *Copeia*, p. 963-969, 1983.
6. LELOUP, P. Various aspects of venomous snake breeding on a large scale. *Acta Zool. Pathol. Antverpiensia*, v. *78*, p. 177-198, 1984.
7. LICHT, P. Reptiles. In: LAMMING, G. E., ed. *Marshalls physiology of reproduction*. Edinburgh: Churchill Livingston, 1984. v. 1, p. 206-282.
8. MURPHY, J. B., MITCHELL, L. A. Miscellaneous note on the reproductive biology of reptiles. Thirteen varieties of the genus *Bothrops* (Serpentes, Crotalidae). *Acta Zool. Pathol. Antverpiensia*, v. *78*, p. 177-198, 1984.
9. SAZIMA, I. Um estudo de biologia comportamental de jararaca (*Bothrops jararaca*) com uso de marcas naturais. *Mem. Inst. Butantan*, v. *50*, n. 3, p. 83-99, 1988.
10. SEIGEL, R.A., FORD, N. B. Reproductive ecology. In: *Snakes ecology and evolutionary biology*. Toronto: Macmillan, 1987. chap. 8, p. 210-252.
11. SHINE, R. Habitats, diets and sympatry in snakes: a study from Australia. *Can. J. Zool.* (In press), 1977.
12. _____. Comparative ecology of three Australian snake species of the genus *Cacophis* (Serpentes, Elapidae). *Copeia*, p. 831-838, 1980.
13. _____. Ecology of eastern Australian whipsnake of the genus *Desmania*. *J. Herpetol.*, v. *14*, p. 381-389, 1980.
14. SOLÓRZANO, A., CERDAS, L. Biologia reproductiva de la cascabel Centroamericana *Crotalus d. durissus* (Serpentes, Viperidae) en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.*, v. *36*, p. 221-226, 1987.
15. VINEGAR, A. Evolutionary implications of temperature induced anomalies of development in snake embryos. *Herpetologica*, v. *30*, p. 72-74, 1974.

SciELO

BOLETIM DE BIOTECNOLOGIA

VOLUME 4 — 1993 ISSN 0103-6548

Secretaria de Estado da Saúde
Coordenação dos Institutos de Pesquisa
Instituto Butantan

COMISSÃO EDITORIAL

Rosalvo Guidolin
Wilmar Dias da Silva
Isaias Raw
Henrique Moisés Canter
Luiz Sebastião Prigenzi
Renata Lara Paes de Barros

SUMÁRIO

Otimização do processo de purificação industrial de toxoide tetânico por gel filtração.
Improvement in the industrial purification of tetanus toxoid by gel filtration.
Sally M.A. PRADO, Mary D.C. VANCETTO, José M. de OLIVEIRA, Fernando FRATELLI, Sandra de J.D. MATHIAS, Hisako G. HIGASHI. 3

Esquema de hiperimunização eqüina mais conveniente à produção de plasma antiveneno Botrópico-Crotálico.
A more suitable equine hyperimmunization schedule for antivenom Bothrops-Crotalus plasma production.
Celso P. CARICATI, Rosalvo GUIDOLIN, Ivone K. YAMAGUSHI, Josefina F. MORAIS, Wilmar DIAS DA SILVA, Hisako G. HIGASHI. 9

BHK cell growth on microcarriers in a bioreactor.
Crescimento de células BHK em microcarregadores utilizando bioreactores.
Ronaldo Z. MENDONÇA, Carlos A. PEREIRA. 13

SciELO

Bol. Biotecnol.
v. 4, p. 3-8, 1993

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO INDUSTRIAL DE TOXÓIDE TETÂNICO POR GEL FILTRAÇÃO

Sally Müller Affonso PRADO *
Mary Dalva Caparroz VANCETTO *
José Marcos de OLIVEIRA *
Fernando FRATELLI *
Sandra de Jesus Delgado MATHIAS *
Hisako Gondo HIGASHI **

RESUMO: A metodologia industrial para obtenção de Toxóide Tetânico (T.T.) atual, consiste na pré-precipitação pelo $(NH_4)_2\ SO_4$ seguida de gel filtração em Sephadex G-50, com a qual obtém-se grau médio de pureza de 2.300 Lf/mgNP, sendo que o mínimo exigido pela O.M.S. é 1.000 Lf/mgNP. Visando basicamente a diminuição do tempo empregado no processo de purificação do T.T., utilizamos resinas cromatográficas de 2ª e 3ª geração, o Sephacryl S-100HR e o Superdex 75 prep grade, respectivamente, que possibilitaram a eliminação da etapa de pré-precipitação pelo $(NH_4)_2\ SO_4$ obtendo-se resultados com grau de pureza ao redor de 3.000Lf/mgNP. A atividade imunogênica destes produtos quando adsorvidos pelo Al $(OH)_3$ em concentração de 15Lf/ml foi de 4,5UI/ml em cobaios. A O.M.S. recomenda que o T.T. induza a formação de no mínimo 2UI/ml nestes animais. O rendimento do processo de purificação foi de 88,46%, que é similar ao obtido no processo atual. A metodologia introduzida permitiu a diminuição do tempo empregado neste processamento assim como a possibilidade de trabalhar-se com purificação em sistema fechado (coluna cromatográfica).

UNITERMOS: Purificação, toxina, toxóide tetânico, gel filtração, Sephacryl S-100HR, Superdex 75 prep grade.

INTRODUÇÃO

Vários métodos para purificação de toxina e anatoxina tetânica tem sido descritos[1,6,7,8,10,11] mas poucos podem ser aplicados em escala industrial para

* Seção de Vacinas Anaeróbicas do Instituto Butantan
** Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção do Instituto Butantan. Av. Vital Brasil, 1500 - CEP 05503-900 - S. Paulo, SP. - Brasil. Suporte Técnico: Assessoria Científica da Pharmacia - Brasil
Recebido para publicação em 04.12.92 e aceito em 07.4.93.

SciELO

a produção de Toxóide Tetânico para uso humano. A importância desta purificação baseia-se fundamentalmente na eliminação de substâncias alergênicas que causariam uma sensibilização no organismo receptor quando da profilaxia contra o tétano.

A eficiência dos adjuvantes minerais utilizados nestes toxóides purificados é maior pois diminui-se o fator de competição entre proteínas específicas e não específicas na fase de adsorção[8].

De acordo com as Normas da Organização Mundial da Saúde (W.H.O.) as anatoxinas tetânicas (A.T.T.), destinadas à produção de vacinas para uso humano, devem apresentar um grau de pureza igual ou maior do que 1.000Lf/mg de nitrogênio protéico[12].

A metodologia utilizada por nosso laboratório consiste na ultrafiltração molecular (10Kd), pré-precipitação pelo sulfato de amônio e gel filtração em Sephadex G-50, com a qual obtém-se grau médio de pureza de 2.300Lf/mg NP [11]. Visando basicamente a diminuição do tempo empregado no processo de purificação do Toxóide Tetânico, nos propusemos verificar a possibilidade de eliminar a etapa de pré-precipitação pelo sulfato de amônio, substituindo-a pela gel filtração nas resinas de 2ª e 3ª geração, Sephacryl S-100HR e Superdex 75 prep grade, respectivamente (Pharmacia LKB)[2].

MATERIAL E MÉTODOS

OBTENÇÃO DE TOXINA TETÂNICA (T.T.):

Lotes de 360 litros produzidos por processo fermentativo[3] utilizando a cepa *Clostridium tetani* Harvard-Caracas, desenvolvida em meio Müeller modificado por Latham[5].

OBTENÇÃO DE ANATOXINA TETÂNICA (A.T.T.):

Através da atividade destoxificante de 10‰ v/v de formalina, durante 30 dias a 37°C, sobre as T.T previamente concentradas 6 a 10 vezes por ultrafiltração molecular (10Kd) e esterilizadas por filtração através de cartuchos de 0,22u.

PURIFICAÇÃO DA ANATOXINA TETÂNICA (A.T.T.):

30 litros de A.T.T. eram lavados com 60 litros de água destilada e concentrados em sistema Pellicon (Millipore) com membrana de 10Kd, recolhíamos 3 amostras para proceder à purificação pelos métodos abaixo descritos:

MÉTODO A: A amostra era precipitada com sulfato de amônio à 33% e ultracentrifugada. Após a diálise e nova filtração tangencial que reduzia o volume cerca de 10 vezes, a A.T.T. era introduzida em coluna de Sephadex G-50 (Pharmacia BCP 252/60) e eluída com solução fisiológica tamponada pH 6,8[11].

MÉTODO B: A amostra era aplicada em uma coluna (Pharmacia XK 26/70) com Sephacryl S-100HR, equilibrada com solução fisiológica tamponada pH 7,0 com fluxo de 1,5ml / minuto. O volume de amostra aplicado correspondia a 1/3 do volume total da coluna. Absorção ultravioleta a 280nm foi empregada como indicação aproximada da concentração de proteínas.

MÉTODO C: A metodologia é similar àquela utilizada no Método B, onde apenas substituiu-se a resina Sephacryl S-100HR pelo Superdex 75 prep grade.

TESTE DE CONTROLE DO PROCESSAMENTO DE PURIFICAÇÃO:

SciELO

1 - DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE FLOCULAÇÃO (Lf): conforme preconizado pela W.H.O.[9, 12].

2 - DETERMINAÇÃO DO NITROGÊNIO PROTÉICO: avaliação quantitativa de nitrogênio protéico e do nitrogênio não protéico pelo método Kjeldahl[12].

3 - DETERMINAÇÃO DE FORMALDEÍDO RESIDUAL: determinação quantitativa de formaldeído, em ppm. O máximo permitido é de 200 ppm[12].

4 - DETERMINAÇÃO DA PUREZA ANTIGÊNICA: é expressa através da relação do valor em Lf/ml e a concentração em mg de nitrogênio protéico/ml. A A.T.T. deverá ter pelo menos 1.000Lf/mg de nitrogênio protéico[12].

5 - PROVA DE TOXICIDADE ESPECÍFICA: conforme preconizada pela W.H.O.[12].

6 - PROVA DE ATIVIDADE IMUNOGÊNICA: através do Método Americano (NIH)[12].

RESULTADOS

Os resultados cromatográficos obtidos através dos métodos A, B e C estão expressos nas Tabelas 1 e 2.

As separações cromatográficas de A.T.T. pelas resinas Sephacryl S-100HR e Superdex 75 prep grade encontram-se nas Fig. 1 e 2 respectivamente.

Todas as amostras submetidas à Prova de Toxicidade Específica apresentaram resultados negativos,ou seja, atóxicas.

A Prova de Atividade Imunogênica das A.T.T. purificadas teve resultados iguais ou maiores que 3,0UI/ml, sendo que, o título mínimo deve ser de pelo menos 2UI/ml[12].

TABELA 1

Resultados de purificação através de gel filtração em Sephadex G-50 (método A) e em Sephacryl S-100HR (método B)

A.T.T.	Lf TOTAL $x10^{-3}$	Lf/mg N Protéico	RENDIMENTO %	FORMALDEÍDO ug/ml
INICIAL	15.6	923		880
SEPHACRYL S-100HR **	13.8	3000	88.5	5.8
INICIAL	10800	620		890
SEPHACRYL S-100HR **	91.53	2755	92.6	5.4
SEPHADEX G-50 *	10320	1651	92.8	7.6
INICIAL	9900	471		640
SEPHACRYL S-100HR**	115.24	5469	99.6	2
SEPHADEX G-50 *	9200	2063	97.3	4.4

* Purificação de A.T.T. pelo método A
** Purificação de A.T.T. pelo método B

SciELO

TABELA 2

Resultados de purificação através de gel filtração em Sephadex G-50 (método A) e em Superdex 75 prep grade (método C)

A.T.T.	Lf TOTAL $x10^{-3}$	Lf/mg N Protéico	RENDIMENTO %	FORMALDEÍDO ug/ml
INICIAL	9900	471		640
SUPERDEX 75**	105	2500	94	4
SEPHADEX G-50*	9200	2063	97.3	4.4
INICIAL	18750	925		900
SUPERDEX 75**	162.5	2156	97.6	5.6
SEPHADEX G-50*	14664	1677	91	11
INICIAL	18560	617		540
SUPERDEX 75**	105.3	2238	100	3.4
SEPHADEX G-50*	18048	1979	98.1	6

* Purificação de A.T.T. pelo método A
** Purificação de A.T.T. pelo método C

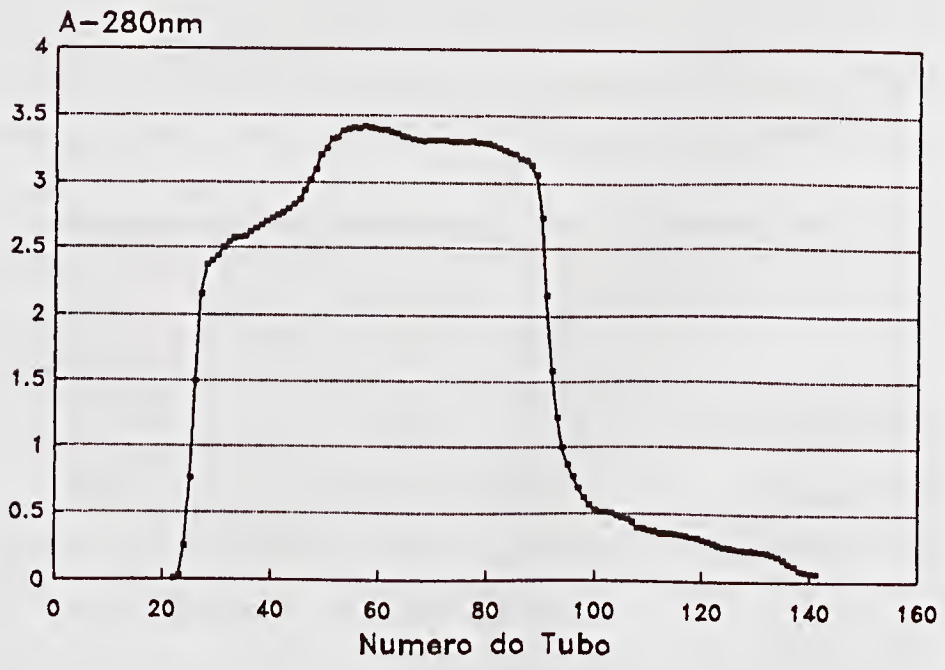

Fig. 1: Gel filtração de ATT em Sephacryl S-100HR

SciELO

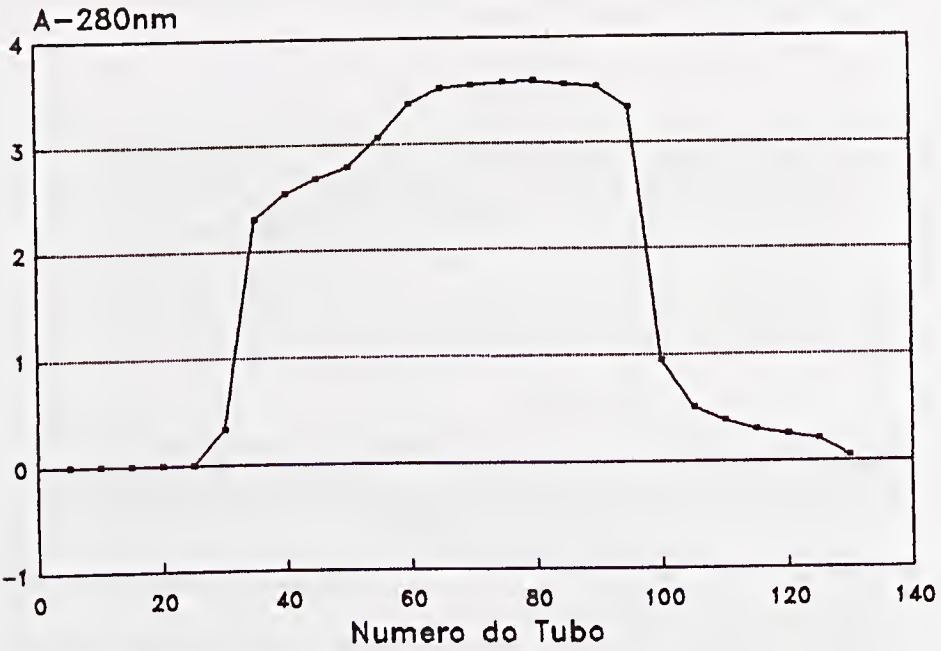

Fig. 2: Gel filtração de ATT em Superdex 75 prep grade

A metodologia industrial para obtenção de Toxóide Tetânico utilizada no Instituto Butantan consiste basicamente em uma pré-precipitação pelo sulfato de amônio seguida de gel filtração em Sephadex G-50 com a qual obtém-se grau médio de pureza de 2.300Lf/mgNP[11]. O tempo empregado neste processo de purificação é de 4 dias, sendo que 50% deste tempo consiste na precipitação pelo sulfato de amônio, ultracentrifugações e diálise.

Utilizando as resinas cromatográficas Sephacryl S-100HR e Superdex 75 prep grade, verificamos que foi possível eliminar o uso do sulfato de amônio, permitindo a diminuição do tempo empregado neste processo assim como, a possibilidade de trabalhar-se com purificação em sistema fechado (coluna cromatográfica).

Pelos resultados obtidos verificamos que o grau de pureza do produto é maior quando utilizamos as resinas Sephacryl S-100HR e Superdex 75 prep grade (Tabelas 1 e 2), (Fig. 1 e 2) e nos permitem sugerir como método industrial prático e econômico para purificação de Toxóide Tetânico.

DISCUSSÃO

A purificação de Toxóide Tetânico para uso humano é de grande importância, pois permite eliminar componentes inespecíficos desnecessários a imunidade contra o tétano, também é importante quando este imunógeno é associado a outras vacinas de uso freqüente na atualidade.

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários da Seção de Vacinas Anaeróbicas pela colaboração no decorrer do desenvolvimento do presente trabalho.

ABSTRACT: The use of Sephacryl-S100HR and Superdex 75 prep grade for preparing tetanus toxoid deleted the $(NH_4)_2\ SO_4$ precipitation step

SciELO

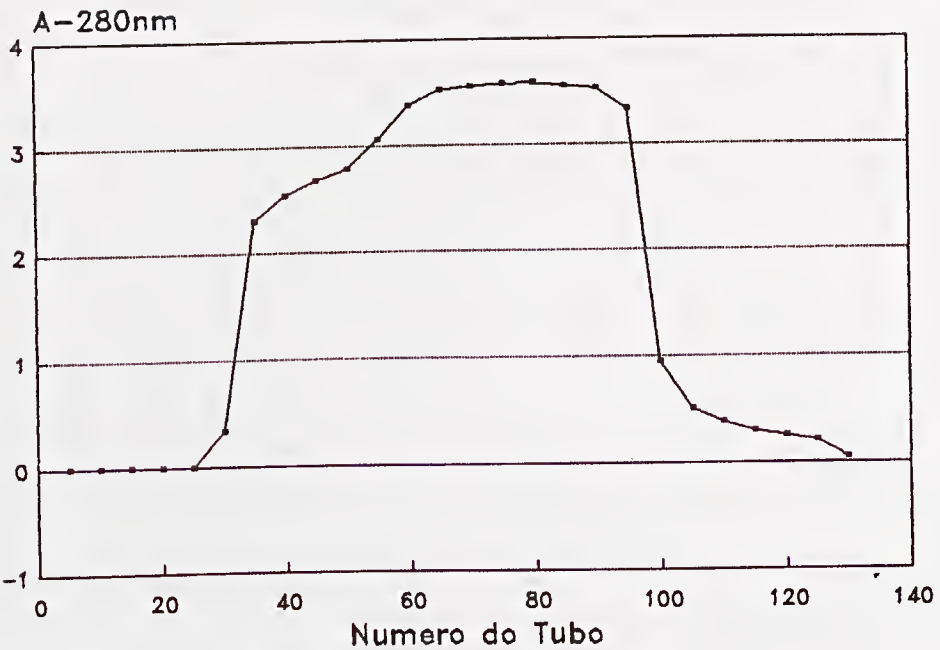

Fig. 2: Gel filtração de ATT em Superdex 75 prep grade

DISCUSSÃO

A purificação de Toxóide Tetânico para uso humano é de grande importância, pois permite eliminar componentes inespecíficos desnecessários a imunidade contra o tétano, também é importante quando este imunógeno é associado a outras vacinas de uso freqüente na atualidade.

A metodologia industrial para obtenção de Toxóide Tetânico utilizada no Instituto Butantan consiste basicamente em uma pré-precipitação pelo sulfato de amônio seguida de gel filtração em Sephadex G-50 com a qual obtém-se grau médio de pureza de 2.300Lf/mgNP[11]. O tempo empregado neste processo de purificação é de 4 dias, sendo que 50% deste tempo consiste na precipitação pelo sulfato de amônio, ultracentrifugações e diálise.

Utilizando as resinas cromatográficas Sephacryl S-100HR e Superdex 75 prep grade, verificamos que foi possível eliminar o uso do sulfato de amônio, permitindo a diminuição do tempo empregado neste processo assim como, a possibilidade de trabalhar-se com purificação em sistema fechado (coluna cromatográfica).

Pelos resultados obtidos verificamos que o grau de pureza do produto é maior quando utilizamos as resinas Sephacryl S-100HR e Superdex 75 prep grade (Tabelas 1 e 2), (Fig. 1 e 2) e nos permitem sugerir como método industrial prático e econômico para purificação de Toxóide Tetânico.

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários da Seção de Vacinas Anaeróbicas pela colaboração no decorrer do desenvolvimento do presente trabalho.

ABSTRACT: The use of Sephacryl-S100HR and Superdex 75 prep grade for preparing tetanus toxoid deleted the $(NH_4)_2\ SO_4$ precipitation step

SciELO

and resulted in a final preparation with a degree of purity of about 3000Lf/mg NP. The material was very immunogenic in guinea pigs. The yield of the purification method was of 88,46% similar to the obtained by the classical industrial process. The new methodology is time saving and allowed to works in a closed system (chromatographic column).

KEYWORDS: Purification, toxins, tetanus toxoids, gel filtration, Sephacryl-S100HR, Superdex 75 prep grade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BIZZINI, B., TURPIN, A., RAYMOND, M. Production et purification de la toxine tetanique. *Ann. Inst. Pasteur*, v. *116*, p. 686-711, 1969.
2. GEL filtration: theory and practice. Pharmacia LKB Biotecnology. A B. S-75182. Uppsala, Sweden, 1991.
3. HERMET, P. Van. Vaccine production as a unit process. *Prog. Ind. Microbiol*, v. *13*, p. 248-260, 1974.
4. LARS, H. et al. Properties, in theory and practice, of novel gel filtration media for stand liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, v. *476*, p. 329-344, 1989.
5. LATHAM, W.C., BENT, B.F., LEVINE, L. Tetanus toxin production in the absence of protein. *Appl. Microbiol.*, v. *10*, p. 146-152, 1962.
6. LATHAM, W.C. et al. Purification and characterization of tetanus toxoid and toxin. *J. Immunol.*, v. *95*, n. 3, p. 487-493, 1965.
7. _____ . Preparative procedure for the purification of toxoid by gel filtration. *Appl. Microbiol.*, v. *15*, n. 3, p. 616-621, 1967.
8. LEVINE, L., STONE, J. L. The purification of tetanus toxoid by ammonium sulfate fractionation. *J. Immunol.*, v. *67*, p. 235-241, 1951.
9. LYING, G., WEISS BETZON, M. The quantitative estimation of diphteria and tetanus toxins: I — The floculation test and Lf — definition. *J. Biol. Stand.*, v. *15*, p. 27-37, 1987.
10. OZUTSUMI, K. et al. Rapid, simplified method for production and purification of tetanus toxins. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. *49*, n. 4, p. 939-943, 1985.
11. PRADO, S. M. A., VANCETTO, M. D. C., FRATELLI, F., PRAL, M. M., OLIVEIRA, J. M., HIGASHI, H. G. Purificação industrial de toxóide tetânico por gel filtração. *Bol. Biotecnol.*, v. *3*, p. 11-16, 1992.
12. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Manual for the production and control of vaccines*: tetanus toxoids. Geneva: W.H.O., 1977.

SciELO

Bol. Biotecnol.
v. 4, p. 9-12, 1993

ESQUEMA DE HIPERIMUNIZAÇÃO EQÜINA MAIS CONVENIENTE À PRODUÇÃO DE PLASMA ANTIVENENO BOTRÓPICO-CROTÁLICO

Celso Pereira CARICATI *
Rosalvo GUIDOLIN **
Ivone Kazuko YAMAGUSHI **
Josefina Farina MORAIS **
Wilmar DIAS DA SILVA ***
Hisako Gondo HIGASHI ****

RESUMO: Na hiperimunização mista de cavalos com antígenos botrópicos e crotálicos é possível que a ação proteolítica dos venenos botrópicos degrade, mesmo que parcialmente, os venenos crotálicos quando, misturados antes da inoculação nos eqüinos. Esta atividade botrópico-proteolítica pode ser um dos fatores responsáveis pelas reduções pela metade, aproximadamente, seja dos títulos soroneutralizantes médios seja da porcentagem de animais que respondem ao estímulo imunogênico a ambos os venenos, se comparados com aqueles obtidos nos animais inoculados com os mesmos venenos isolados e em dias diferentes.

UNITERMOS: Venenos, hiperimunização botrópico-crotálico, atividade proteolítica.

INTRODUÇÃO

Os soros antivenenos botrópico-crotálico são de utilidade nos casos em que há dúvidas sobre o gênero ao qual pertence a serpente responsável pelo acidente. Tais dúvidas podem ocorrer ou porque a captura do ofídio não foi realizada e as lesões locais do acidente sejam bizarras ou por falta de conhecimento da pessoa que estiver socorrendo o acidentado.

* Seção de Obtenção de Plasmas Hiperimunes, Instituto Butantan
** Seção de Concentração e Fracionamento de Soros, Instituto Butantan
*** Laboratório Especial de Imunoquímica, Instituto Butantan
**** Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção do Instituto Butantan - Av. Vital Brasil, 1500 CEP 05503-900 - São Paulo, SP - Brasil
Recebido para publicação em 28.01.93 e aceito em 03.05.93

SciELO

CARICATI, C.P., GUIDOLIN, R., YAMAGUSHI, I.K., MORAIS, J.F., DIAS DA SILVA, W., HIGASHI, H.G. Esquema de hiperimunização eqüina mais conveniente à produção de plasma antiveneno Botrópico-Crotálico. Bol. Biotecnol., v. 4, p. 9-12, 1993.

A produção do antiveneno botrópico-crotálico era feita por inoculação em cavalos, de mistura de venenos botrópicos e crotálicos. Os soros obtidos, via de regra, apresentavam títulos baixos de anticorpos antiveneno crotálico. O enriquecimento desses soros com o anticrotálico exige o uso de preparações muito potentes para evitar a diluição dos anticorpos botrópicos. Tendo em vista que os venenos botrópicos são ricos em enzimas proteolíticas[2,5], potencialmente capazes de clivar a crotoxina[4] e torná-la menos imunogênica, foi delineado esquema de imunização dos cavalos, injetando-os com os venenos botrópicos e crotálicos isolados e em diferentes locais. Os respectivos títulos neutralizantes foram determinados pelo método de Vital Brasil[1]. Os resultados foram comparados tanto do ponto de vista de títulos quanto do de porcentagens de animais que responderam a ambos os antígenos. Todos os animais eram soroprodutores e submetidos a diversas reimunizações com os venenos botrópicos e crotálicos antes destas experiências.

MATERIAL E MÉTODOS

CAVALOS: Animais de raça indefinida, pesando ao redor de 350 quilos, com quatro a oito anos de idade por ocasião do início da hiperimunização. Todos os animais eram soroprodutores e submetidos a diversas reimunizações com os venenos botrópicos e crotálicos antes destas experiências.

ANTÍGENO: *Venenos botrópicos* — obtidos de sete espécies do gênero botrópico *(B. jararaca, B. jararacussu, B. neuwiedi, B. pradoi, B. cotiara, B. alternatus* e *B. moojeni)*, misturados na proporção de 50% de *B. jararaca* e 8,33% de cada um dos seis venenos mencionados. Os venenos, até o momento da preparação dos antígenos, foram conservados em estado seco (seco a vácuo) e a 4°C.

Venenos crotálicos — venenos de *Crotalus durissus terrificus* e de *Crotalus durissus collineatus*, misturados na proporção de 50% de cada uma das espécies. A técnica de conservação foi a mesma descrita para os venenos botrópicos.

ESQUEMAS DE REIMUNIZAÇÃO UTILIZADOS

TABELA 1

Esquemas de reimunização: mg de venenos, volume de salina e de adjuvante de Freund Incompleto inoculado e espaço de tempo entre as inoculações.

ESQUEMA	DIA	0	11º	12º	13º
E 1	VENENO	(M) 5,0mgB+5,0mgC	(M) 2,5mgB+2,5mgC	(M) 2,5mgB+2,5mgC	2,5mgB+2,5mgC
	SALINA	5ml	10ml	10ml	10ml
	ADJUVANTE	(AFI) 5ml	—	—	—
E 2	DIA	0	7º	14º	16º
	VENENO	5,0mgC	5,0mgB	5,0mgC	5,0mgB
	SALINA	5ml	5ml	10ml	10ml
	ADJUVANTE	(AFI) 5ml	(AFI) 5ml	—	—

B — botrópico — C — crotálico — M — mistura — (AFI) — Adjuvante de Freund Incompleto.

SciELO

Os antígenos foram inoculados na região dorsal dos animais e os volumes totais subdivididos em três partes e cada uma delas injetada por via subcutânea, em pontos diferentes, distando, aproximadamente, de 20cm cada ponto.

Os títulos de antivenenos foram determinados 10 dias após a última inoculação em cada esquema. Os números de cavalos envolvidos nas observações foram os seguintes: esquema tradicional utilizado pelo Instituto Butantan (E 1), 250 cavalos; esquema proposto (E 2), 55 cavalos.

Os animais foram constantemente alimentados com sete quilos diários de ração balanceada (22% de proteína), capim verde ou feno (dependendo da época) e água "ad libitum".

SANGRIAS PARA PRODUÇÃO: O sangue foi extraído por punção da veia jugular, na proporção de 4% em relação ao peso dos animais (2% iniciais e 2% após 48 horas), e coletados em bolsas plásticas contendo 400 ml de solução anticoagulante isotônica (1,47% de dextrose, 4,8% de citrato de sódio e 1,47% de ácido cítrico).

DOSEAMENTO: Para a determinação dos títulos soroneutralizantes (SN) dos antivenenos, foi utilizado o método de Vital Brazil[3].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com os diferentes esquemas de reimunização encontram-se na *Tab. 2*.

TABELA 2

Títulos SN de cavalos submetidos a diferentes esquemas de reimunização com venenos botrópicos e crotálicos.

ESQUEMAS	NÚMERO DE ANIMAIS	TÍTULOS *SN MÉDIOS		% DE ANIMAIS COM TÍTULOS SN	
		BOTRÓPICO	CROTÁLICO	BOTRÓPICO CROTÁLICO	SOMENTE BOTRÓPICO
E 1	250	1,23	0,28	35,7	64,2
E 2	55	1,87	0,57	79,2	20,8

* mg de venenos de referência *(B. jararaca* e *C. d. terrificus)* neutralizados por ml de plasma. SN — Soroneutralizante.

Pelo exame da Tab. 2, observa-se que E 2 proporcionou um aumento de 103,5% no título SN do antiveneno crotálico em relação ao esquema que vinha sendo aplicado. Deve, ainda, ser ressaltada a porcentagem de animais que respondem a ambos os estímulos imunogênicos (botrópico e crotálico), substancialmente aumentada.

• Supõe-se que os resultados superiores de SN, obtidos com a fração crotálica pela aplicação do E 2, estariam ligados à ausência de atividade proteolítica dos venenos botrópicos[2,4,5] que poderia agir sobre o antígeno(s) crotálico quando misturados mesmo sendo o material mantido a 4°C antes da inoculação.

No que diz respeito ao consumo de venenos exigido pelo E 2, nas condições destas experiências, em relação ao E 1, ele foi 20% menor.

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15

CARICATI, C.P., GUIDOLIN, R., YAMAGUSHI, I.K., MORAIS, J.F., DIAS DA SILVA, W., HIGASHI, H.G. Esquema de hiperimunização eqüina mais conveniente à produção de plasma antiveneno Botrópico-Crotálico. **Bol. Biotecnol.**, v. 4, p. 9-12, 1993.

ABSTRACT: In the horse's mixed hyperimmunization with *Bothrops Crotalus* Venoms it is possible that the *Bothrops* venom's proteolytic action degenarates part of the *Crotalus* venom if they are mixed before inoculation, probably this proteolytic activity is one of the factors responsable by seroneutralization titer reduction and animals that reply to *Crotalus* and *Bothrops* immunogenic stimulation, when compared with the results obtained with the same venoms inoculated separately and in different days.

KEYWORDS: Venoms *Bothrops-Crotalus* hyperimmunization, proteolytic activity.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRAZIL, V. Dosagem do valor antitóxico dos serums antipeçonhentos. *Trib. med.* (Rio de Janeiro), v. *14*, n. 3, p. 39, 1908.
2. DEUTSCH, H.F., DINIZ, C.R. Some proteolytic activities of snakes venoms. *J. biol. chem.*, v. *216, p. 17, 1955.*
3. *FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2. ed. São Paulo: Siqueira, 1959. p.1034.*
4. *IWANAGA, S., SUZUKI, T. Enzimes in snakes. In: LEE, C. Y. Snake venoms.* Berlin: Springer-Verlag, 1979, Cap.21, p.684 (Handbook of experimental pharmacology, 52).
5. KOCHOLATY, W.F., LIDFORD, E.B., DAYLY, J.G., BILLINGS, T.A. Toxicity and some enzymatic properties and activities in the venom of Crotalinae, Elapidae and Vipiridae. *Toxicon*, v.*9*, p.31, 1971.
6. MEBS, D. A comparative study of enzyme activities in snake venoms. *Inst. J. Biochem.*, v. *1*, p. 335, 1970.

SciELO

Bol. Biotecnol.
v. 4, p. 13-16, 1993

BHK CELL GROWTH ON MICROCARRIERS IN A BIOREACTOR

Ronaldo Z. MENDONÇA
Carlos A. PEREIRA *

ABSTRACT: BHK21C13 an VERO cells were cultivated on microcarriers in a 5 liters bioreactor. The BHK21C13 cell concentration increased gradually to a peak of 1.5 x 10^6 cells/ml after 4 days of culture, and that of VERO cells reached a peak of 5 x 10^5 cells/ml after 6 days of culture. The BHK21C13 cells were shown to grow faster than VERO cells, and after 4 days of culture, about 98% of microcarriers were totally covered of BHK21C13 cells, when only about 35% of them were totally covered of VERO cells. This procedure was found to be efficient to prepare these cell cultures in concentrations high enough to allow its utilization as a substract for virus growth and veterinarian or human vaccines production.

KEYWORDS: BHK21C13 cells, bioreactor, microcarriers

The BHK21 clone 13 (BHK21C13) cells have been used for the preparation of several different vaccines of veterinary use, such as foot and mouth disease and rabies. These cells can grow in suspension and bioreactors of large volumes have been utilized by the veterinarian vaccine manufactors for its production[17].

A great diversity of cell cultures of mammalian [2,3,4,15,16] or avian origin[1,5] as well as human diploid cell[11,12] and heteroploid cell lines[6,7] are currently used today as substract for human vaccine production. Montagnon et al 1984a and 1984b[8,9] developed a large-scale methodology for VERO cell culture and production of vaccines in this cell line, which has been recommended by the World Health Organization as a substract for human vaccine production, such as rabies and poliomielitis[18]. Recently, Rifky, 1987[13] utilized a low capacity bioreactor of 5 liters, allowing the preparation of VERO cell cultures in suspension, to vaccine production.

Laboratório de Imunologia Viral Instituto Butantan — São Paulo — 05503-900 — S. Paulo, SP — Brazil
* To whom correspondence should be addressed
Recebido para publicação em 01.03.93 e aceito em 03.05.93.

SciELO

It is of great interest, the standardization of simplified methods of cell cultures to prepare vaccines for veterinarian as well as human use, suitable for developing countries where high tecnology infrastructure is still not available and where several viral diseases are usually endemic.

Microcarriers (Cytodex I — Pharmacia) at a concentration of 2 mg/ml were washed three times in phosphate buffered saline (PBS) without Ca^{++} and Mg^{++} and autoclaved at 120°C for 30 minutes. After cooling at room temperature, they were incubated with 200 ml of fetal calf serum (FCS) for 30 minutes. The cells were then added and mantained at 37°C and 50 rpm.

BHK21C13 cells, obtained from the Instituto Pasteur, São Paulo, Brasil, and VERO cells obtained from the Pfizer Laboratories, São Paulo, Brasil, were cultivated in Leibovitz (L15) medium, supplemented with 2 mM of glutamine and containing 5% fetal calf serum (FCS). A cell bank prepared with these cells was used in all the experiments. The cells were grown in monolayer cultures (Roux bottles) or in suspension, using a Celligen Cell Culture System (New Brunswick Scientific Co., Ltda.), with work capacity of 3.7 liters, containing 2mg/ml of microcarriers (Cytodex I — Pharmacia). Suspensions of 8 x 10^4 cells/ml in L15 medium, and 5% FCS, were added to the bioreactor maintained at 37°C and 50 rpm. The microcarriers were daily collected, observed at the microscope and the cells counted in a Neubauer chamber.

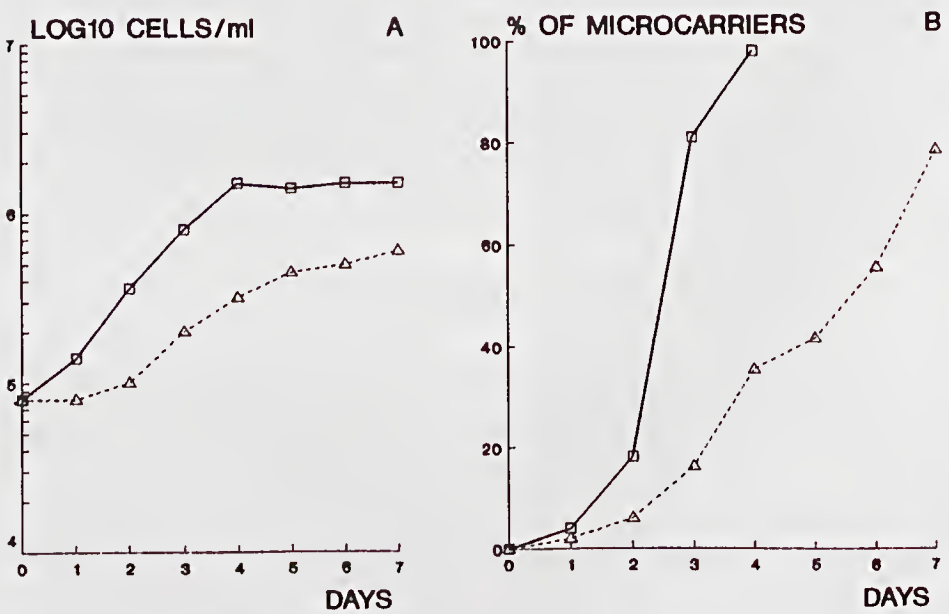

Fig. 1. Kinetics of BHK21C13 and VERO cell growth (A) and attachment (B) to microcarriers in a 5 liters bioreactor. 2 mg/ml of microcarriers suspended in 3.7 liters of medium in a bioreator, were inoculated with 8 x 10^4 BHK21C13 (□) or VERO cells (▵). The cultures were performed at 37°C and 50 rpm and different times after, samples were taken, the percents of microcarriers totally covered by cells were evaluated by microscopical observation, and the number of cells, expressed as Log_{10} of cells/ml, was obtained by counting the cells after separation from the microcarriers by trypsin treatment.

SciELO

As shown in Figure 1A, the BHK21C13 cell concentration increased gradually to a peak of 1.5 x 10^6 cells/ml after 4 days of culture and remained high until day 7 of culture. The VERO cell growth paralleled that of BHK21C13 cells, but the cell concentration was always lower, reaching a peak of 5 x 10^5 cells after 6 days of culture. The data in figure 1B confirm that on figure 1A, showing that after 4 days of culture about 98% of microcarriers were totally covered of BHK21C13 cells, when only about 35% of microcarriers were totally covered of VERO cells. A high percent (about 80%) of microcarriers totally covered of VERO cells were observed only after 7 days of culture.

Different types of cell cultured vaccines have been padronized and used in several countries[1,10,12,14,17,18,19], in order to replace those prepared in animal tissues, which often continues to be used in developing countries. Recently-developed vaccines can only be produced in cell cultures, which constitute a technology that many countries are not able to easily acquire or develop, due to high costs or lack of suitable infrastructure.

With the aim to develop a methodology that permits the establishment of cell cultures, and consequently the production of vaccines for veterinarian or human use, we carried on the technological studies presented in this paper. We describe a methodology that permits the production of veterinarian vaccines with BHK21C13 cells, as well as human vaccines with VERO cells, in a small and simple to handle bioreactor. This methodology is suitable for countries that do not dispose of high infrastructure and where several diseases, that can be avoided by vaccination, are endemic and the need of a local production of good vaccines is important.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the European Economic Community (EEC TS2*0190-F. EDB) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de S. Paulo (FAPESP). C. A. Pereira is a recipient of CNPq research fellowship. The authors are grateful to A. C. Barbosa and M. L. Silva for their technical assistance.

RESUMO: Células BHK21C13 e VERO foram cultivadas em microcarregadores em um bioreator de 5 litros. A concentração de células BHK21C13 aumentou gradualmente atingindo um pico de 1.5 x 10^6 células/ml após 4 dias de cultura, e a concentração de células VERO alcançou um pico de 5 x 10^5 células/ml após 6 dias de cultura. As células BHK21C13 apresentaram um crescimento mais rápido do que o apresentado pelas células VERO, e após 4 dias de cultura aproximadamente 98% dos microcarregadores mostraram-se totalmente cobertos de células BHK21C13, quando apenas aproximadamente 35% deles mostraram-se totalmente cobertos de células VERO. Este processo mostrou-se eficiente para o preparo destas culturas celulares em concentrações altas o suficiente para permitir sua utilização como substrato para o crescimento de vírus e produção de vacinas para uso veterinário e humano.

UNITERMOS: Células BHK21C13, bioreator, microcarregador

REFERENCES

1. ARAI, Y.T., OGATA, T., OYA, A. Studies on japanese produced chick embryo cell culture rabies vaccines. *Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 44,* p. 131-134, 1991.

SciELO

2. ATANASIU, P., TSIANG, H., GAMET, A. Nouveau vaccin antirabique humain de culture cellulaire primaire. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)., v. 125B,* p. 419-432, 1974.
3. BERLIN, B.S., MITCHELL, J.R., BURGOYNE, G.H., OLESON, D., BROW, W.E., GOSWICK, C., MCCULLOUGH, N.B. Rhesus diploid rabies vaccine (adsorbeb). A new rabies vaccine. Results of initial clinical studies of preexposure vaccination. *J. Amer. Ass., v. 247,* p. 1726-1728, 1982.
4. BURGOYNE, G.H., KAJIYA, K.D., BROWN, D.W., MITCHELL, J.R. Rhesus diploid rabies vaccine (adsorbed): a new rabies vaccine using FRhL-2 cells. *J. Infect. Dis., v. 152,* p. 204-210, 1985.
5. KONDO, A., TAKASHIMA,Y., SUZUKI, M. Inactivated rabies vaccine of chick embryo cell culture origin. *Symp. Ser. Immunobiol. Stand., v. 21,* p. 182-189, 1974.
6. MONTAGNON, B.J., FANGET, B., NICOLAS, A.J. The large scale cultivation of VERO cells in microcarrier culture for virus vaccine production. Preliminary results for killed poliovirus vaccine. *Dev. Biol. Stand., v. 47,* p. 55-64, 1981.
7. _____. FOURNIER, P., VINCENT-FALQUET, J.C. A new rabies vaccine for human use: preliminary report. In: CONGRESS RABIES IN THE TROPICS, Tunis. *Proceedings*, [s.n.t.] p. 3-6, 1983.
8. _____. VINCENT-FALQUET, J.C., FANGET, B. Thousand litres scale microcarrier culture of VERO cells. *Dev. Biol. Stand., v. 55*, p. 37-42, 1984.
9. _____. FANGET, B., VINCENT-FALQUET, J.C. Industrial-scale production of inactivated poliovirus vaccine prepared by culture of VERO cells on microcarriers. *Rev. Infect. Dist., v. 6*, p. 210-213, 1984.
10. MERED, B., ALBRECHT, HOPE, E. HOPPS, PETRICCIANI, J.C., SALK, J. Propagation of poliovirus in microcarrier cultures of three monkey cell lines. *J. Biol. Standard., v. 9*, p. 137-145, 1981.
11. PLOTKIN, S.A. Vaccine production in human diploid cell strain. *Am. J. Epidemiol., v. 94*, p. 303-306, 1971.
12. _____. Rabies vaccine prepared in human cell culture: progress and perspectives. *Rev. Infect. Dist., v. 2*, p. 443-447, 1980.
13. RIFKY, M. EL-KARAMANI. Production in VERO cells of an inactivated rabies vaccine from strain FRV/K for animal and human use. *Acta Virol., v. 31*, p. 321-328, 1987.
14. ROUMIANTZEFF, M., AJAN, N., MONTAGNON, B., VINCENT FALQUET, J.C. Rabies vaccine produced in cell culture. *Ann. Inst. Pasteur. Virol., v. 136E*, p. 413-424, 1985.
15. SUREAU, P., PERRIN, P., HORAUD, F. A rabies vaccine produced in a non-tumorogenic rabbit cell line. *Dev. Biol. Stand., v. 60*, p. 133-139, 1985.
16. VAN WEZEI, A.L., VAN STEENIS, G. Production of an inactivated rabies vaccine in primary dog kidney cells. *Dev. Biol. Stand., v. 40*, p. 69-75, 1978.
17. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Transfer of technology for rabies vaccine production: new strains available for VERO and BHK cells culture. *Bull. WHO.*, p. 65-941, 1987.
18. _____. Requeriments for continous cell lines used for biological substances. *WHO Tech. Rep. Ser., n. 745*, p. 99-115, 1987.
19. _____. Acceptability of cell substracts for production of biologicals. *WHO Tech. Rep. Ser., n. 747*, p. 5-24, 1987.

SciELO

COMPOSICÃO, FOTOLITO E IMPRESSÃO
IMPRENSA OFICIAL
DO ESTADO S.A. IMESP
Rua da Mooca, 1921 — Fone: 291-3344
Vendas, ramais: 257 e 325
Telex: 011-34557 — DOSP
Caixa Postal: 8231 — São Paulo
C.G.C. (M.F.) N.º 48.066.047/0001-84

GOVERNO DE SÃO PAULO
CONSTRUINDO UM FUTURO MELHOR

SciELO

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

1. Somente serão aceitos trabalhos inéditos e que se destinem exclusivamente à revista. É proibida a reprodução com fins lucrativos. Os artigos de revisão serão publicados a convite da Comissão Editorial.
2. Os trabalhos deverão ser redigidos em português, inglês ou francês, datilografados preferencialmente em máquina elétrica, em espaço duplo em 3 (três) vias, em papel formato ofício e numerados no ângulo superior direito.
3. No preparo do original será observada, sempre que possível, a seguinte estrutura: **Página de rosto:** título do artigo, nome(s) do(s) autor(es) e filiação científica. **Texto:** introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos e referência bibliográfica. **Material de referência:** resumos (em português e inglês); **unitermos:** palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo; devem ser incluídas até um limite máximo de três, em português e inglês.
4. As referências bibliográficas deverão ser ordenadas alfabeticamente e numeradas.
   Exemplos:
   Para livros: autor, título, edição, local de publicação, editor, ano, páginas.
   7. BIER, O. **Microbiologia e imunologia.** 24. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985. 1234p.
   Para artigos: autor, título do artigo, título do periódico, volume, página inicial e final, ano.
   8. MACHADO, J.C., SILVEIRA F°, J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. **Mem. Inst. Butantan, v.40/41,** p. 1-9, 1976/77.
   As citações no texto devem ser por números-índices correspondentes às respectivas referências bibliográficas.
   Exemplos:
   ...método derivado de simplificação de armadilha de Disney[1]
   ...segundo vários autores[2,3,4]
5. As ilustrações (fotos, tabelas, gráficos etc.) deverão ser originais e acompanhadas de legendas explicativas. As legendas serão numeradas e reunidas em folha à parte. Os desenhos deverão ser a nanquim e as fotografias bem nítidas, trazendo no verso o nome do autor e a indicação numérica da ordem a ser obedecida no texto. As ilustrações deverão ser organizadas de modo a permitir sua reprodução dentro da mancha da revista (22 x 12,5cm).
6. Os artigos deverão conter no máximo 6 (seis) ilustrações (branco e preto). De cada trabalho serão impressas 30 (trinta) separatas, sendo 10 para a Biblioteca do Instituto e 20 para os autores.
7. Os textos originais não serão devolvidos e os originais das ilustrações estarão à disposição dos autores.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

1. Manuscripts submitted to the Editorial Board should be unpublished texts and should not be under consideration for publication elsewhere. Reproduction for commercial purposes is not allowed. The Editorial Board will plan the publication of revision articles.
2. The original and two copies of papers should be typewritten in Portuguese, English or French, double spaced, on typing paper (31 x 21cm). Pages should be numbered consecutively at the upper right corner.
3. The following structure should be considered in the preparation of the manuscript: **Title page:** with article title, name of author(s), professional address. **Text:** with introduction, material and methods, results, discussion, conclusions, acknowledgments, references, abstracts (in Portuguese and English), and keywords. A maximal number of 03 keywords should be included in Portuguese and English.
4. References in alphabetical order should be numbered consecutively.
   Examples:
   Books:
   7.BIER, O. **Microbiologia e imunologia.** 24.ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985. 1234p.
   Articles:
   8. MACHADO,J.C., SILVEIRA F°, J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. **Mem.Inst. Butantan, v.40/41,** p. 1-9, 1976/77.
   Citations in the text should be identified by the reference number.
   Examples:
   ...método derivado de simplificação de armadilha de Disney[1]
   ...segundo vários autores[2,3,4]
5. Illustrations (photographs, tables, figures etc.) should be the originals and legends should be submitted typewritten on a separate sheet. Line-drawings should be with China ink and photographs must be of top quality. On the back of each figure of photograph the name of the author(s) should be lightly written and the number indicating the sequence in the text. Illustrations should fit in a page measuring 22 x 12,5cm.
6. No more than 6 illustrations will be accepted and photographs should be black and white. Thirty reprints of each article are provided without charge, and 10 will be kept at the library.
7. Submitted manuscripts will not be returned to the author(s) but the original illustrations are available to author(s) by request.

SciELO

ISSN 0073 – 9901

IMPRENSA OFICIAL
DO ESTADO S.A. IMESP
SÃO PAULO – BRASIL
1993

GOVERNO DE SÃO PAULO
(CONSTRUINDO UM FUTURO MELHOR)

SciELO